

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



*El Papel del Sistema Fas/FasL como  
Modificador de la Resistencia/Susceptibilidad a  
la Inducción de Linfomas Tímicos*

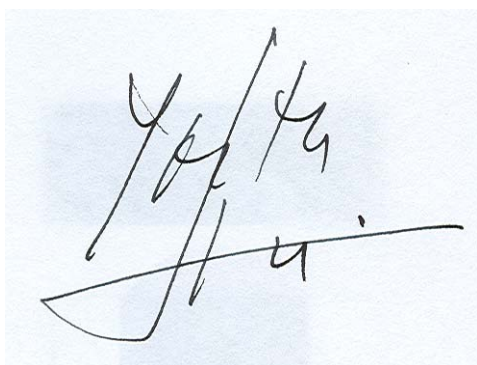
TESIS DOCTORAL

MARÍA C. VILLA MORALES  
Madrid, 2006

D. José Fernández Piqueras, Catedrático de Genética de la Universidad Autónoma de Madrid, y D. Javier Santos Hernández, Profesor Titular de Genética de la Universidad Autónoma de Madrid, certifican que **Dña. María C. Villa Morales** ha llevado a cabo bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado:

**“El papel del sistema Fas/FasL como modificador de la resistencia/susceptibilidad a la inducción de linfomas tímicos”**

Revisada la presente memoria, consideran que reúne todos los méritos necesarios para su presentación y defensa.



Prof. José Fernández Piqueras  
Catedrático de Genética, UAM



Dr. Javier Santos Hernández  
Prof. Titular de Genética, UAM

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se ha contado con la siguiente financiación:

- María C. Villa Morales ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia, con referencia AP2002-0294, durante cuatro años desde el 1 de enero de 2002.
- “Genes modificadores de resistencia/susceptibilidad a linfomas tímicos inducidos mediante radiación gamma”. SAF2003-05048. Ministerio de Ciencia y Tecnología. 2004-2006. Responsable: Prof. José Fernández Piqueras.
- “DNA damage repair, genomic instability and radiation-induced cancer”. FI6R-CT-2003-508842. European Committee. EURATOM Reseca and Training Programme on Nuclear Energy. Work Programme 2003. Coordinador: Laure Savatier (La. De Radiobiologie et Oncologie. Fontenay-aux-Roses, France). 2004-2008. Responsable: Dr. Javier Santos Hernández.
- “Clasificación molecular de los procesos linfoproliferativos: Subproyecto genes modificadores de resistencia/susceptibilidad en modelos animales”. PI050384. Instituto de Salud Carlos III. 2006-2007. Responsable: Prof. José Fernández Piqueras.
- Lymphoma Network, G03/179 del Ministerio de Salud y Consumo. Coordinador nodo UAM: Prof. José Fernández Piqueras.

El desarrollo de esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Oncogene (2006) 25, 2022–2029. Featured.  
“Functional Fas (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphoma.”  
Villa-Morales M, Santos J and Fernández-Piqueras J.
- Clinical and Translational Oncology. 2006; 8(5): 349-53.  
“Lack of correlation between DNA copy number and mRNA expression levels of c-myc in  $\gamma$ -radiation-induced mouse thymic lymphomas by using quantitative real-time PCR”  
Javier Santos, Concepción Vaquero, Janet Reyes, Pilar López-Nieva, María Matabuena, María Villa, Pablo Fernández, and José Fernández Piqueras.
- Cancer Research. En revisión.  
“A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas.”  
María Villa-Morales, Javier Santos and José Fernández-Piqueras.

*A Luisa*

*"La verdadera profesión del hombre es encontrar el camino hacia sí mismo"*

Hermann Hesse

Este camino que va dondequiera  
es de yuyos de asfalto o de granito  
pasa por la dulzura o por el odio  
y su marco es el canto de los grillos

de a trozos es la ruta del amor  
y aquí y allá captura a los amantes  
atraviesa la aduana de los celos  
y acompaña la ruta de las aves

cuando parte del alba o se diluye  
con la puesta de sol que está tan solo  
el camino se cubre de hojas secas  
comunicando que llegó el otoño

camino de otro cielo/maravilla  
de la intuición la brújula el impulso  
debemos transitarlo sin preguntas  
hasta el diáfano umbral de otro futuro.

Mario Benedetti

Cómo resumir en un folio o dos la experiencia de cuatro años... Lo encuentro difícil, casi más que escribir la tesis en sí, que al menos para ésta tiene un espacio de sobra...

El caso es que al final de este camino, una mira hacia atrás y parece que fue ayer mismo cuando José Fernández Piqueras y Javier Santos confiaron en mí, y me animaron a empezar en esto del laboratorio, y cómo no, a terminar la carrera empezada haciendo lo más difícil pero lo más bonito, Bioquímica. Fue el empujón definitivo.

También parece que no ha pasado el tiempo desde que por fin un día, como buena pipiola de quinto, vine al laboratorio y me recibieron María, Pilar, Conchi, Janet, Nerea, y otros que después han ido yendo y viniendo (Marta, Gloria, Manu, Montse, Patri, las niñas de prácticas...). Y claro, con los años, llegaron “las nuevas”, Laura, M<sup>a</sup> José, Rosa, e Inma.

Pues de todos he aprendido mucho, científica pero sobre todo personalmente. María me adoptó nada más llegar, y hemos pasado muchos momentos, más que con nadie, que para eso llevamos ya unos pocos de años juntas... los buenos y los malos, que todos merecen ser recordados, porque eso es la vida.

“Las nuevas”, por su parte, se han abierto paso y se han hecho un gran hueco en mi corazón, porque nada es más agradable que desvariar un poco y reírse de todo durante desayunos, comidas, meriendas y cañitas... Habéis sido geniales, me habéis hecho reír, me habéis consolado al llorar, y sobre todo, me habéis aguantado todo tipo de humores...

Claro que, no me puedo dejar atrás a aquella gente que, de modo totalmente desinteresado, siempre me prestó su ayuda, como los del 1.12 y 1.13 del IIB (Mar, Ester, Héctor, Eva, M<sup>a</sup> Marta, Miri, Diana, y todos los demás, que a todos os he pedido algo alguna vez), o como Sonia del CNB (qué habría hecho yo sin ti las dos primeras veces...).

Y hablando de este tema, para ti, Edu, necesitaría escribir todo un libro, porque en un párrafo no podré expresar ni la milésima parte de lo que me has dado. Ayuda (montones de trabajo, de productos de todo tipo, y de materiales tan valiosos como el famoso vector... jeje), apoyo (siempre, pase lo que pase), experiencia (como gran investigador que ya eres), calma (la que a mí me falta), serenidad (la que tú nunca pierdes), sabiduría (la que siempre has demostrado

tener, el más listo y el más inteligente), ideas (oye, ¿cómo lo haces para que se te ocurran siempre esas cosas?), optimismo (¿qué habría sido de mí sin él?)... GRACIAS.

Claro que mis padres y hermanos tampoco se quedan atrás. Ya desde que me vine a estudiar a Madrid, con mis dieciocho añitos, y con no poco esfuerzo por su parte, confiaron en mí. Luego, y sin entender ni papa de qué narices es eso de un gen supresor o la apoptosis, me han brindado un apoyo siempre incondicional, con una especie de fe ciega en mí, como confiando siempre en que lo que hago está bien. Eso es algo que no se puede compensar de ninguna manera. Juan, Paqui, Cande, Juanito y Pupe. Sois los mejores.

También me acuerdo ahora de todos mis amigos, que comprenden y apoyan siempre todo lo que hago. Los de Badajoz: Rebeca, Ana, Álex, Edu, Fran, Ester, Zaida, Jose, PinkFloyd... Siempre que vuelvo, después de meses sin veros, parece que nunca me fui. Y los de aquí, que también me habéis aguantado lo vuestro: Ángel, Elena, Celia, Libe, Miguel, Elena, Isma, Fiti, Pedro, Guillermo, Pablo, Sara... Os quiero.

Está claro que ahora, al ver esto de la tesis tan cerca, sólo puedo pensar que vosotros habéis conseguido que venga feliz al labo todas las mañanas (bueeeeno, o casi todas...), que disfrute como una enana cuando salgo, y que siempre tenga ganas de veros.

¡¡Gracias a todos!!



## *Abreviaturas*

**AICD:** *Activation Induced Cell Death*, Muerte celular inducida por activación.

**ALPS:** *Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*, Síndrome linfoproliferativo autoinmune.

**AP-1:** *Activator Protein 1*, Proteína activadora 1.

**Apaf-1:** *Apoptotic Protease Activating Factor 1*, Factor activador de proteasa apoptótica 1.

**Bid:** *BH3 Interacting Domain death agonist*, Dominio agonista de muerte que interacciona con BH3.

**CAP-3:** *Cytoplasmic Antiproteinase 3*, Antiproteinasa citoplásmica 3.

**CD3:** *Cluster of Differentiation 3*, Conglomerado de diferenciación 3.

**cDNA:** *Complementary Deoxyribonucleic Acid*, Ácido desoxirribonucleico complementario.

**cM:** centiMorgan.

**CRD:** *Cysteine-Rich Domain*, Dominio rico en cisteínas.

**DD:** *Death Domain*, Dominio de muerte.

**DED:** *Death Effector Domain*, Dominio efector de muerte.

**DISC:** *Death Inducing Signalling Complex*, Complejo de señalización inductor de muerte.

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

**DNA:** *Deoxyribonucleic Acid*, Ácido desoxirribonucleico.

**FADD:** *Fas Associated Death Domain*, Dominio de muerte asociado a Fas.

**FasL:** Fas Ligando

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*, Suero fetal bovino.

**FRET:** *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, Transferencia de energía de resonancia fluorescente.

**HEPES:** 4-(2-Hidroxiethyl)-1-Piperazinethanosulfonic Acid.

**ICS:** *Interspecific Consomic Strains*, Cepas consómicas interespecíficas.

**IL-2:** *Interleukina 2*.

**IRCS:** *Interspecific Recombinant Congenic Strains*, Cepas congénicas recombinantes interespecíficas.

**JNK:** *c-Jun N-terminal Kinase*, c-Jun N-terminal quinasa.

**kDa:** kiloDalton.

**LOH:** *Loss of Heterozygosity*, Pérdida de heterocigosidad.

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase*, quinasa proteínica activada por mitógenos.

**MHC:** *Major Histocompatibility Complex*, Complejo principal de histocompatibilidad.

**mRNA :** *Messenger Ribonucleic Acid*, Ácido ribonucleico mensajero.

**NF-κB:** *Nuclear Factor Kappa B*.

**NF-AT:** *Nuclear Factor of Activated T cells*, Factor nuclear de células T.

**NF-E2:** *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)*: Factor nuclear derivado de eritrocitos-2.

**NK:** *Natural Killer*.

**PBS:** *Phosphate Buffer Saline*, Tampón salino fosfato.

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa.

**PLAD:** *Pre-Ligand Assembly Domain*, Dominio de ensamblaje previo al ligando.

**PMA:** *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*.

**PMSF:** *Phenylmethylsulphonylfluoride*.

**qRT-PCR:** *Quantitative Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, cuantitativa a tiempo real.

**RITL:** *Radiation-Induced Thymic Lymphoma*, Linfoma tímico inducido por radiación.

**RLU:** *Relative Luminescence Units*, Unidades relativas de luminiscencia.

**RNA:** *Ribonucleic Acid*, Ácido ribonucleico.

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute*.

**RT-PCR:** *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

**SDS-PAGE:** *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS.

**SIDA:** *Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida*.

**TCR:** *T Cell Receptor*, Receptor de Célula T.

**Tlyr1:** *Thymic Lymphoma Resistance Locus 1*, Locus de resistencia al linfoma tímico.

**TNF:** *Tumour Necrosis Factor*, Factor de necrosis tumoral.

**TNFR:** *Tumour Necrosis Factor Receptor*, Receptor del factor de necrosis tumoral.

# *Resumen*

El sistema Fas/FasL media la apoptosis inducida en timocitos inmaduros y linfocitos T periféricos, pero aún se sabe poco de su implicación en la susceptibilidad genética al desarrollo de linfomas linfoblásticos de células T.

En esta tesis se demuestra por primera vez que la expresión de los genes *Fas* y *FasL* aumenta significativamente como respuesta inmediata a la radiación, manteniéndose niveles altos durante todo el periodo de latencia en los ratones que resistieron al desarrollo de los linfomas. Sin embargo la expresión de ambos genes es casi inexistente en los linfomas tímicos.

Curiosamente, existen diferencias significativas en los niveles de expresión de *Fas* y *FasL*, entre cepas de ratón con distinta susceptibilidad, que podrían ser atribuidas a polimorfismos funcionales encontrados en los promotores de ambos genes. Las cepas con fenotipo más resistente tienen los niveles más altos de *Fas* y de *FasL*, mientras que las cepas más sensibles tienen los niveles más bajos de ambos genes. Además, las actividades promotoras inducidas por radiación presentan una buena correlación con los niveles de expresión transcripcional de *Fas* y *FasL*, y concuerdan con el grado de susceptibilidad de las cepas.

Por otro lado, se han encontrado polimorfismos funcionales en las secuencias codificantes de ambos genes en las distintas cepas, que afectan significativamente a la capacidad del sistema Fas/FasL para inducir apoptosis. La existencia de estos polimorfismos en la línea germinal de las cepas de ratón, sugiere que el riesgo genético a padecer este tipo de linfomas está modulado por dos tipos de controles: uno cuantitativo que afectaría a los niveles de expresión génica, y otro cualitativo que afectaría a la actividad biológica del sistema. Estos resultados avalarían la utilización de la radioterapia como un tratamiento eficaz en este tipo de tumores.

# *Summary*

The Fas/FasL system mediates induced apoptosis of peripheral T-lymphocytes, but little is known about its implication inside the thymus and in the genetic susceptibility to thymic lymphomagenesis.

In this thesis we demonstrate for the first time that the expressions of both *Fas* and *FasL* significantly up-regulate early in all mice after  $\gamma$ -radiation treatments, maintaining such high levels for a long time in mice that resisted tumour induction. However, their expressions are practically absent in T-cell-lymphoblastic-lymphomas.

Interestingly, there exist significant differences in their levels of expression between mice strains with distinct susceptibilities that can be attributed to promoter functional polymorphisms. Those strains with the most resistant phenotype exhibit the highest levels of both genes, whereas the most susceptible ones show the lowest levels of both *Fas* and *FasL*. Moreover, promoter activities in response to single-high doses of radiation correlated well with the levels of *Fas* and *FasL* expression, and are consistent with the degree of strain susceptibility.

In addition, several functional nucleotide changes in the coding sequences of both *Fas* and *FasL* genes significantly affect the capacity of the Fas/FasL system to induce apoptosis. These results lead us to propose that germ-line functional polymorphisms affecting either the levels of expression (quantitative effects) and/or the biological activity of the Fas/FasL system (qualitative effects) could account, at least in part, for the genetic risk to develop T-cell lymphoblastic lymphomas, and support the use of radiotherapy as an adequate procedure to choose in the treatment of T cell malignancies.

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.- Papel biológico del sistema Fas/FasL.....	2
1.1.- Las moléculas Fas y FasL.....	2
1.2.- Funciones generales .....	3
1.2.1.- Apoptosis .....	3
1.2.2.- Activación y/o proliferación .....	6
1.2.3.- Señalización pro-inflamatoria.....	6
1.2.4.- Señalización de tipo necrótica .....	7
1.3.- La apoptosis mediada por Fas/FasL en el sistema inmune.....	7
1.3.1.- Muerte celular inducida por activación (AICD) .....	7
1.3.2.- Citotoxicidad mediada por linfocitos T .....	8
1.3.3.- Privilegio inmune.....	8
1.3.4.- Selección positiva y negativa de timocitos .....	9
1.3.5.- Muerte de los timocitos por negligencia .....	9
2.- Consecuencias patológicas de las alteraciones del sistema Fas/FasL.....	10
2.1.- Mutaciones en los genes <i>Fas</i> y <i>FasL</i> .....	10
2.2.- Alteraciones en la expresión.....	13
3.- Implicaciones de <i>Fas</i> y <i>FasL</i> en procesos tumorales.....	13
3.1.- Bases genéticas del cáncer.....	13
3.1.1.- Proto-oncogenes.....	13
3.1.2.- Genes supresores de tumores.....	14
3.1.3.- Genes de reparación .....	14
3.1.4.- Genes menores de resistencia/susceptibilidad .....	14
3.2.- Polimorfismos funcionales de <i>Fas</i> y <i>FasL</i> y cáncer.....	15
3.3.- Papel del sistema Fas/FasL en el desarrollo de los linfomas tímicos inducidos con rayos $\gamma$ : nuestro modelo sitúa a <i>Fas</i> como posible gen supresor .....	16
3.3.1.- Las zonas de LOH repartidas por el genoma permiten definir genes candidatos .....	16
3.3.2.- La utilización de cepas consómicas y congénicas sugiere que <i>Fas</i> puede comportarse como un gen de susceptibilidad al desarrollo de linfomas T murinos.....	18
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
1.- Ratones.....	24
2.- Tratamientos .....	24
3.- RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	24
4.- Genotipado de los promotores de <i>Fas</i> de ratón.....	36
5.- Genotipado de los promotores de <i>FasL</i> de ratón.....	26
6.- Genotipado de los cDNA de ratón de <i>Fas</i> y <i>FasL</i> .....	27
7.- Secuenciación de DNA y comparación entre secuencias .....	28
8.- Clonaje del promotor de <i>Fas</i> y construcciones para los ensayos de luciferasa .....	28
9.- Clonaje del promotor de <i>FasL</i> y construcciones para los ensayos luciferasa .....	29
10.- Clonaje de los cDNA de <i>Fas</i> y <i>FasL</i> .....	29
11.- Cultivos celulares y transfecciones .....	29
12.- Ensayos de Promotor: actividad Luciferasa .....	30
13.- Ensayos de apoptosis .....	30
14.- Western Blots.....	31
15.- Métodos estadísticos .....	32



<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
1.- Animales y tratamientos	34
2.- El análisis transcripcional de <i>Fas</i> sugiere su implicación en la linfomagénesis tímica	35
3.- Análisis comparativo de los patrones de expresión transcripcional de <i>Fas</i> en las diferentes cepas de ratón con diferente susceptibilidad tumoral	37
4.- Existen numerosos cambios de nucleótidos en los promotores de <i>Fas</i> que permiten diferenciar entre las cepas de ratón	39
5.- Los cambios nucleotídicos encontrados en los promotores de <i>Fas</i> constituyen polimorfismos funcionales que afectan a los niveles de expresión transcripcional	41
6.- Análisis de los patrones de expresión transcripcional de <i>FasL</i>	44
7.- Existen numerosos cambios de nucleótidos entre los promotores de <i>FasL</i> de las distintas cepas de ratón	48
8.- Los cambios nucleotídicos encontrados en el promotor de <i>FasL</i> constituyen polimorfismos funcionales	50
9.- También hay numerosos cambios de nucleótidos en las secuencias codificantes de <i>Fas</i> y de <i>FasL</i>	53
10.- Los cambios nucleotídicos encontrados en los cDNAs de <i>Fas</i> y <i>FasL</i> son polimorfismos funcionales que afectan a la actividad biológica del sistema	56
11.- El carácter funcional de los polimorfismos se confirmó mediante Western-blotting, con anticuerpos que discriminan las formas activas e inactivas de las caspazas	57
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
1.- El sistema <i>Fas/FasL</i> podría constituir una barrera defensiva frente al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación gamma	62
2.- Las variaciones en los niveles de expresión de <i>Fas</i> y <i>FasL</i> podrían explicar las diferencias en susceptibilidad de las diferentes cepas de ratón	64
3.- La respuesta diferencial de <i>Fas</i> y <i>FasL</i> se podría explicar por la existencia de polimorfismos funcionales en sus regiones promotoras	65
4.- El sistema <i>Fas/FasL</i> de la cepa resistente es más efectivo en la inducción de apoptosis	67
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO</b>	<b>87</b>

# *Introducción*

## **1.- Papel biológico del sistema Fas/FasL**

### **1.1.- Las moléculas Fas y FasL**

Fas es un receptor de membrana, perteneciente a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (*tumour necrosis factor receptor*, TNFR), también conocido como CD95 o APO-1, codificado por un gen con un espectro amplio de expresión en diferentes tejidos (corazón, hígado, bazo, timo etc). En el ser humano, el locus *FAS* está situado en el cromosoma 10, en la banda citogenética 10q24.1, y codifica una glicoproteína de membrana de tipo I, de 319 aminoácidos y unos 48 kDa. En el ratón, el gen ortólogo (*tnfrsf6/Fas*), codifica una glicoproteína de 327 aminoácidos, y está localizado en el cromosoma 19 (23.0 cM).

Tanto en un caso como en otro, la proteína Fas cuenta con varios dominios fundamentales, especialmente el dominio de muerte (*death domain*, DD) situado en la porción intracelular, que es común a otros miembros de la familia TNFR, y que resulta esencial para llevar a cabo la función principal de esta proteína: la inducción de una vía de señalización apoptótica. En su porción extracelular, la proteína cuenta con tres dominios ricos en cisteína, de tipo TNFR (*cysteine-rich domain*, CRD), llamados CRD1, CRD2 y CRD3, que son también de gran importancia para la funcionalidad del sistema, ya que, según se ha descrito, la formación del dominio de ensamblaje pre-ligando (*pre-ligand assembly domain*, PLAD) se produce a través de los CRD1 de tres moléculas de Fas en la membrana (Chan et al., 2000; Golstein, 2000; Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000b). Por otro lado, la interacción de Fas con su ligando, FasL, se produce a través de CRD2 y CRD3.

El ligando correspondiente FasL pertenece igualmente a la superfamilia TNF. En el ser humano el gen correspondiente (*FASL*) está situado en el cromosoma 1 dentro de la banda citogenética 1q23. Produce una proteína de membrana de tipo II, de 281 aminoácidos y 31.5 kDa, que contiene un dominio rico en prolinas y un dominio común a la familia TNF. En el ratón, el gen ortólogo (*tnfsf6/FasL*), codifica una glicoproteína de 279 aminoácidos, y está localizado en el cromosoma 1 (85.0 cM).

La proteína FASL puede ser liberada en su forma soluble desde la membrana tras ser proteolizada por metaloproteinasas. Al contrario que Fas la expresión del gen que codifica el ligando tiene un carácter mucho más restringido. Se puede detectar

claramente su expresión en linfocitos T activados, células NK (*natural killer*), y en sitios con “privilegio inmune”, como el ojo, la placenta, los testículos, y las células tumorales (Lee and Ferguson, 2003; Moulian and Berrih-Aknin, 1998).

## **1.2.- Funciones generales**

### **1.2.1.- Apoptosis**

La vía extrínseca de apoptosis mediada por el sistema Fas/FasL se inicia con la unión de ligando y receptor. Inmediatamente se produce la agregación de Fas, seguida de un cambio en la configuración de su dominio DD, el reclutamiento de la proteína FADD (*Fas associated death domain*) por interacción homotípica a través de sus DD, y la formación del complejo de señalización inductor de muerte (*death-inducing signalling complex*, DISC) (Figura 1). La proteína FADD contiene además un dominio efector de muerte (*death effector domain*, DED) en su extremo N-terminal, a través del cual recluta varias moléculas adicionales: dos isoformas de caspasa-8 (caspasa-8/a y caspasa-8/b), caspasa-10, y CAP-3 (Boldin et al., 1996; Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995; Muzio et al., 1996). La procaspasa-8 es proteolizada en el DISC a través de tres pasos consecutivos, para dar lugar a la caspasa-8 activa, que consiste en un heterotetrámero de dos subunidades p10 y dos subunidades p18. El prodominio de la caspasa-8 permanece en el DISC, mientras que la caspasa activa se disocia para continuar la cascada de caspasas (Medema et al., 1997; Salvesen and Dixit, 1999). La caspasa-8 activada es capaz de activar directamente a la caspasa-3, efectora que a su vez proteoliza los sustratos que conducen a la muerte celular (vía extrínseca). Además, la caspasa-8 activa puede estimular la vía intrínseca o mitocondrial, que finalmente converge con la extrínseca en la caspasa-3.

Según la vía apoptótica de preferencia, las células se pueden clasificar en dos categorías fundamentales (Barnhart et al., 2003; Scaffidi et al., 1998). Las células de tipo I eligen la vía extrínseca, o independiente de la mitocondria, mediada fundamentalmente por el sistema Fas/FasL; mientras que las células de tipo II eligen la vía intrínseca, dependiente de la mitocondria. En las células de tipo I, la estimulación de Fas por FasL da lugar a un reclutamiento de FADD muy eficiente, que a su vez recluta y activa grandes

cantidades de caspasa-8. Sin embargo, en las células de tipo II, la formación del DISC es muy ineficiente, produciéndose muy poca cantidad de caspasa-8 activa, que resulta insuficiente para activar directamente a la caspasa-3, aunque suficiente para estimular la vía mitocondrial (intrínseca), mediante la proteólisis de la proteína Bid. La translocación de Bid a la mitocondria induce la liberación de factores clave en la señal apoptótica, como citocromo-c y Apaf-1, que se unen a la caspasa-9 para formar el denominado “Apoptosoma”. Así, la vía mitocondrial actúa como amplificadora de la señal.

La fase de iniciación de la señal de Fas/FasL consta de cinco sucesos que también distinguen a las células de tipo I de las de tipo II (Algeciras-Schimmich and Peter, 2003; Algeciras-Schimmich et al., 2002):

- Preasociación de las moléculas de receptor independiente del ligando, a través del PLAD.
- Formación de microagregados, una vez unido el ligando.
- Formación del DISC, de forma dependiente de F-actina.
- Agrupamiento de receptores, de forma dependiente de caspasa-8 activa.
- Internalización de estos *clusters*, de forma dependiente de F-actina.

En el caso de las células de tipo II, la señalización vía Fas es independiente de actina, y no se produce la internalización del DISC. Aunque muchos receptores, al activarse por la unión de su ligando, se agrupan y después se internalizan para incorporarse a la vía lisosomal y atenuar así la señal que inducen, este no es el caso del sistema Fas/FasL, ya que la internalización de los complejos en las células de tipo I contribuye a aumentar la intensidad de la señal y el ensamblaje de los efectores con las dianas intracelulares. De hecho, la internalización es necesaria para la activación de la vía apoptótica; de otra forma el resultado sería la activación de otras vías no apoptóticas. Por tanto, se podría decir que el compartimiento subcelular determina la funcionalidad del sistema, llevando a la célula hacia la muerte celular o hacia la supervivencia (Lee et al., 2006).

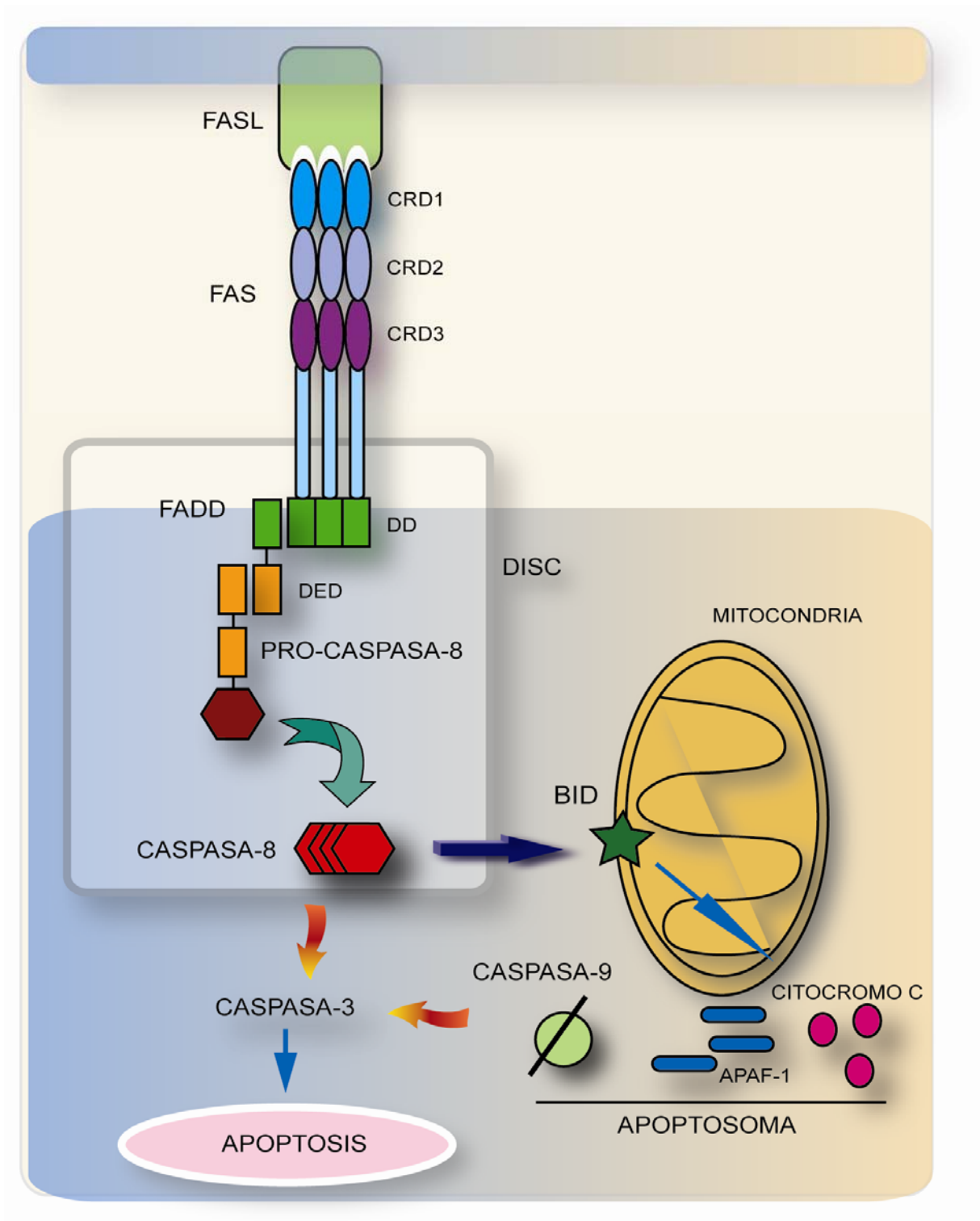


FIGURA 1: Vías de señalización a apoptosis mediadas por el sistema Fas/FasL.

### **1.2.2.- Activación y/o proliferación**

Aunque su papel más conocido, y posiblemente más importante, sea la inducción de apoptosis, existen numerosas evidencias acerca del papel del sistema Fas/FasL en vías de señalización activantes y proliferativas. Se ha demostrado que varios miembros de la superfamilia TNF pueden regular tanto apoptosis como proliferación, supervivencia y diferenciación celular. De hecho, parece que todos los miembros de la superfamilia TNF pueden activar a NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción implicado en supresión de la apoptosis, supervivencia, proliferación, replicación viral, inflamación, reabsorción ósea, tumorigénesis y metástasis (Gaur and Aggarwal, 2003).

Se ha llegado a proponer un modelo según el cual Fas podría activar tanto la vía apoptótica como la vía de NF- $\kappa$ B/MAPK. De acuerdo con esta hipótesis, para que se active la vía apoptótica sería necesario que *Fas* tuviera sus dos alelos funcionales e intactos. Sin embargo, para que se active la vía de NF- $\kappa$ B/MAPK se requeriría solamente un alelo funcional (Legembre et al., 2004; Peter et al., 2005). Si esto fuese así, habría que admitir que el alelo mutado sería suficiente para eliminar la vía apoptótica y actuaría como dominante negativo.

El papel multifuncional del sistema Fas/FasL (Siegel et al., 2000a) se evidencia también en algunos estudios que han demostrado que FasL es capaz de promover proliferación y secreción de IL-2 en respuesta a dosis subóptimas de anti-CD3 (Alam et al., 1999; Chun et al., 2000; Kennedy et al., 1999); además se sabe que los inhibidores de las caspasas-3 y 8 pueden inhibir la proliferación de células T en respuesta a anti-CD3 dependiendo de la dosis de IL-2. También se ha sugerido que FADD podría tener una función en la proliferación de células T (Zhang et al., 1998).

### **1.2.3.- Señalización pro-inflamatoria**

La inhibición de las caspasas bloquea la apoptosis, e induce un cambio de la vía de señalización apoptótica por la proinflamatoria (Scheller et al., 2002). Esto ocurre mediante la activación de NF- $\kappa$ B, y conduce a la expresión de TNF- $\alpha$ . Se ha propuesto que la estimulación de *Fas* en células T activadas recluta un complejo de señalización proinflamatoria que se degrada rápidamente si las caspasas están activas. Sin embargo,

si no lo están, el complejo se estabiliza y es capaz de activar las vías que conducen a la expresión de citoquinas.

#### **1.2.4.- Señalización de tipo necrótica**

Se ha demostrado en varios tipos celulares que *Fas* puede intervenir también en vías de señalización que conducen a la necrosis de la célula, si la actividad de las caspasas está inhibida (Holler et al., 2000; Lemaire et al., 1998; Vercammen et al., 1998). En el caso de células Jurkat, el mecanismo es de cinética lenta y requiere grandes cantidades de ligando. Por tanto esta posible actividad de *Fas* tendría, en cualquier caso, una dudosa relevancia biológica (Vonarbourg et al., 2002).

### **1.3.- La apoptosis mediada por *Fas/FasL* en el sistema inmune**

#### **1.3.1.- Muerte celular inducida por activación (AICD)**

Una vez finalizado el proceso de maduración y diferenciación dentro del timo, los linfocitos T entran en el torrente sanguíneo y desde ahí circulan hasta los órganos linfoides periféricos donde se activan en presencia de los correspondientes antígenos. La activación de los linfocitos T se produce por estimulación vía TCR, generándose la respuesta inmune apropiada. Después, los linfocitos T reactivos deben ser eliminados mediante un mecanismo de muerte celular inducida por activación (*Activation Induced Cell Death*, o AICD) mediado principalmente por el sistema *Fas/FasL* (Krammer, 2000; Moulán and Berrih-Aknin, 1998). Las funciones de este proceso de muerte celular son esencialmente tres:

- Eliminar las células autorreactivas de la periferia que no sufrieron selección en el timo.
- Llevar a cabo la muerte por negligencia de aquellas células T maduras periféricas que no son suficientemente estimuladas por las señales de crecimiento.
- Limitar la expansión de la respuesta inmune, eliminando los linfocitos activados que hayan cumplido su función y ya no se necesiten.



Este mecanismo proporciona al sistema inmune la posibilidad de un control homeostático capaz de mantener el balance entre proliferación y muerte celular. La sensibilidad de las células T periféricas a la AICD depende de que el organismo necesite iniciar o terminar una respuesta inmune. Las células T recién activadas son resistentes a la AICD, de forma dependiente de la cantidad de IL-2 producida, que determina la fase de expansión clonal y la fase efectora. Paradójicamente, la presencia prolongada de IL-2 puede provocar un cambio que convierte a las células resistentes en células sensibles, para que al terminar la respuesta inmune puedan ser eliminadas. Esta transición de un fenotipo resistente a apoptosis a un fenotipo sensible se corresponde con un aumento en la capacidad de formar el DISC, suponiendo por tanto una transición desde el tipo celular II al tipo I (Baumann et al., 2002; Krueger et al., 2003; Schmitz et al., 2003).

El desarrollo de las células T de memoria también está relacionado con la apoptosis mediada por Fas/FasL. Se ha descrito que las células de memoria proceden de las anteriores células T con fenotipo resistente a la apoptosis, que sufrirían de nuevo una transición hacia el fenotipo sensible a la apoptosis (Baumann et al., 2002; Schmitz et al., 2003).

### **1.3.2.- Citotoxicidad mediada por linfocitos T**

Las células diana activadas que expresan Fas en su superficie son susceptibles de ser eliminadas por linfocitos T citotóxicos capaces de expresar FasL. Se trata de un mecanismo alternativo al de la perforina-granzima, y está implicado en la resistencia a patógenos y en el rechazo de trasplantes y tumores (Krammer, 2000; Moulán and Berrih-Aknin, 1998).

### **1.3.3.- Privilegio inmune**

Los tejidos en cuestión pueden escapar del rechazo del sistema inmune en condiciones de citotoxicidad reducida (Moulán and Berrih-Aknin, 1998). El ojo es el prototipo de sitio con privilegio inmune. Expresa constitutivamente FasL para controlar la inflamación eliminando las células linfoides que expresan Fas e invaden el tejido. Otros sitios con privilegio inmune son los testículos, los ovarios y la placenta (Lee and Ferguson, 2003).

### **1.3.4.- Selección positiva y negativa de timocitos**

Todo lo comentado hasta ahora hace referencia al papel del sistema Fas/FasL en la periferia, pero el asunto no está tan claro cuando se trata de la actuación del sistema dentro del timo (Figura 2). La selección “negativa” consiste en la eliminación por apoptosis de los timocitos cuyos TCR se unen con alta afinidad a los complejos MHC-péptido antigénico propios. Es un proceso mediado fundamentalmente por células dendríticas y macrófagos, que resulta esencial para asegurar la auto-tolerancia del sistema inmune. Se ha demostrado la implicación en este proceso de varios receptores de la superfamilia de TNFR; sin embargo, la implicación del sistema Fas/FasL es sujeto de una gran controversia (Baumann et al., 2002; Moulán and Berrih-Aknin, 1998; Rathmell and Thompson, 2002). Durante la selección “positiva”, los timocitos se seleccionan en base al MHC propio. Sólo aquellos timocitos cuyo TCR es capaz de interactuar con el MHC propio son rescatados y seleccionados positivamente, mientras que aquellos cuyo receptor reconoce con baja afinidad al MHC propio, mueren por negligencia. La selección positiva es un proceso mediado exclusivamente por las células epiteliales de la corteza tímica, que proporcionan señales de supervivencia, rescatando a los timocitos de la apoptosis. La eliminación de los timocitos durante los procesos de selección positiva o negativa pueden implicar distintas vías apoptóticas (Baumann et al., 2002).

El papel de Fas en el desarrollo de los timocitos ha sido sugerido en varios artículos de diferentes grupos, que aportan algunas evidencias sobre la posible implicación del sistema Fas/FasL en la selección negativa y/o positiva de los timocitos en ratones adultos, dependiendo de la dosis de antígeno (Castro et al., 1996; Debatin et al., 1994; Fleck et al., 1998; Kishimoto and Sprent, 1997; Kishimoto et al., 1998; Kurasawa et al., 1999; Moulán et al., 1998; Yonehara et al., 1994). De acuerdo con estos resultados Fas no sería el único mediador de la apoptosis durante la selección negativa en el timo, pero participaría en la selección clonal bajo determinadas circunstancias.

### **1.3.5.- Muerte de los timocitos por negligencia**

La muerte por “negligencia” es un proceso que se produce por la falta de señales positivas, y no por la presencia de señales negativas. Ocurre cuando los timocitos no expresan un TCR funcional, y por tanto no reciben la señal de selección positiva. Los

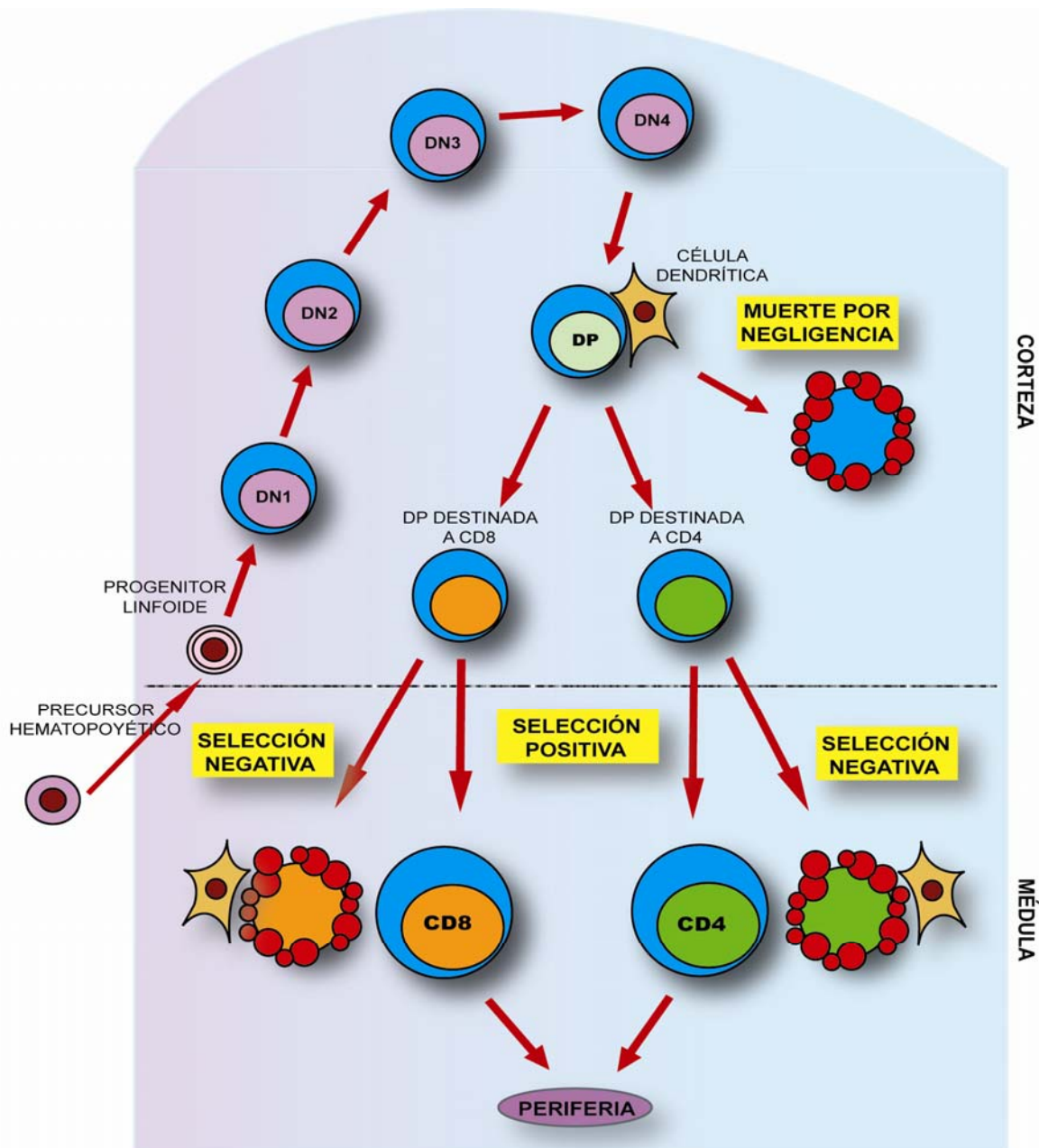
linfocitos T maduros que una vez en la periferia no reciben citoquinas o antígenos, y los linfocitos que pierden la afinidad por el antígeno de selección durante el proceso de hipermutación somática, también mueren por negligencia (Rathmell and Thompson, 2002).

## **2.- Consecuencias patológicas de las alteraciones del sistema Fas/FasL**

Las alteraciones en la funcionalidad del sistema Fas/FasL pueden contribuir al desarrollo de enfermedades de tipo autoinmune, pero también están implicadas en el SIDA y en algunos procesos tumorales.

### **2.1.- Mutaciones en los genes Fas y FasL**

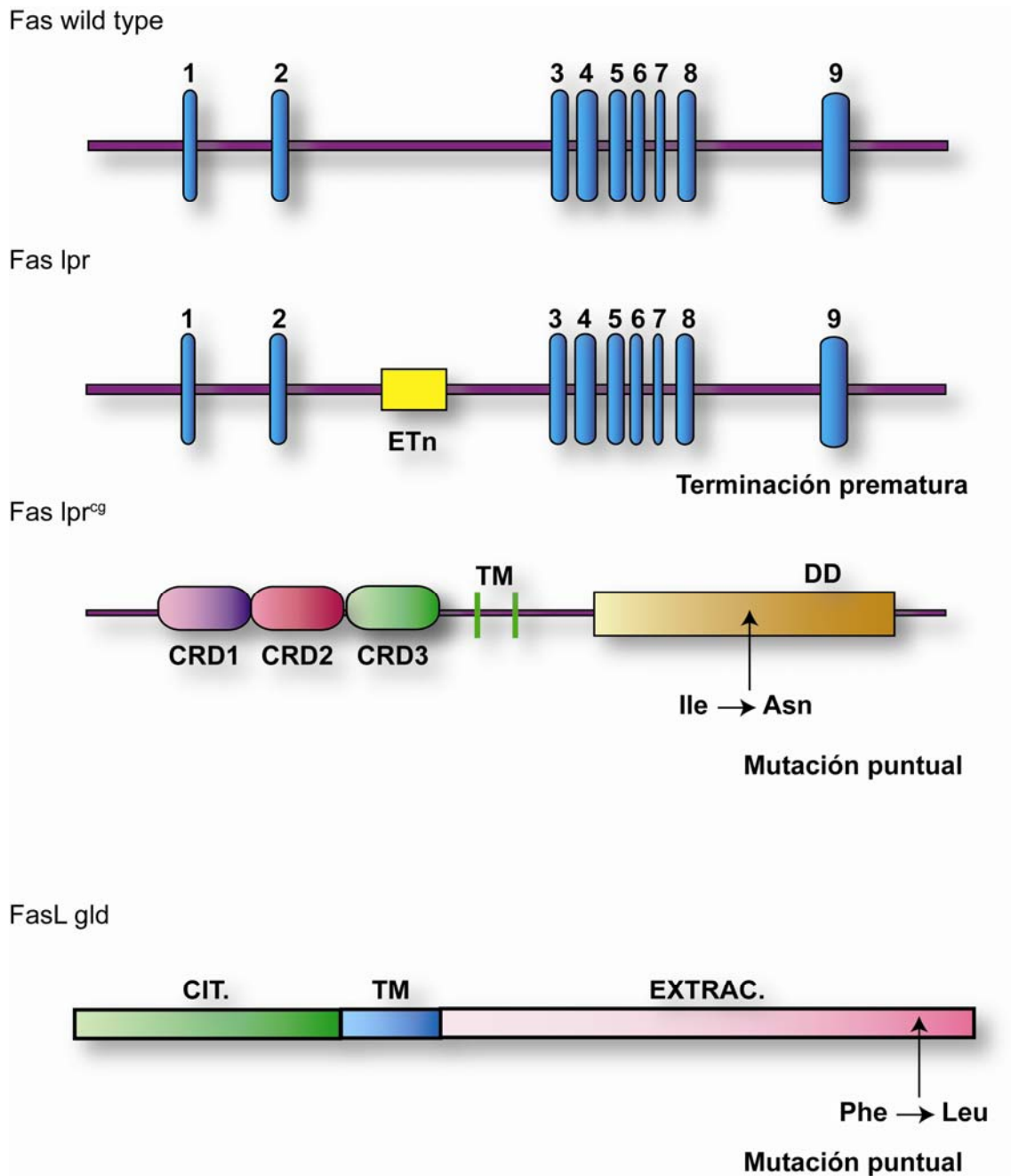
Existen bastantes referencias bibliográficas sobre tres mutaciones que determinan la pérdida de función en los genes *Fas* y *FasL*: *lpr*, *lpr<sup>cg</sup>*, y *gld* (Adachi et al., 1993; Takahashi et al., 1994; Watanabe-Fukunaga et al., 1992) (Figura 3). Estas mutaciones provocan la acumulación anormal de células T dobles negativas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) ocasionando linfadenopatías y esplenomegalias, y finalmente la muerte del ratón a los cinco meses de edad por enfermedades autoinmunes (Cohen and Eisenberg, 1991; Moulán and Berrih-Aknin, 1998). En el ser humano, los defectos en la AICD y en las poblaciones periféricas de células T y B causados por mutaciones en los genes *Fas* y *FasL* provocan un trastorno similar, el síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) de tipo I (si el gen mutado es *Fas*) o de tipo II (si fuera *FasL*). Los niños con ALPS o síndrome de Canale-Smith presentan una linfadenopatía masiva y autoinmunidad severa (Chan et al., 1999; Fisher et al., 1995; Krammer, 2000).



**FIGURA 2: Desarrollo de las células T en el timo.**

Los precursores linfoides migran al timo, donde inicialmente progresan como dobles negativos (DN) a través de cuatro estados de diferenciación (DN1 al DN4), para después pasar a dobles positivos (DB), por la expresión exitosa del TCR. El destino de los DP dependerá de la afinidad de interacción de su TCR con el MHC presentado por las células corticales epiteliales. Si la afinidad es demasiado baja, mueren por negligencia. Si es demasiado alta, mueren por selección negativa. Sólo los que presenten una afinidad intermedia, sufrirán selección positiva, y continuarán su diferenciación hacia células T simples positivas CD8+ o CD4+. Éstas son finalmente exportadas a la periferia.

Modificado a partir de (Germain, 2002)



**FIGURA 3: Mutaciones en Fas y FasL que generan los ratones lpr y gld.**

- En la mutación lpr se inserta un elemento trasponible en el intrón 2 que da lugar a la terminación prematura de la transcripción.
- En la mutación lpr<sup>cg</sup> se da una mutación puntual en el dominio de muerte, de Isoleucina a Asparagina, por la que Fas no puede unir a FADD, y por tanto no se da la transducción de la señal de muerte.
- En la mutación gld, se da una mutación puntual cerca del extremo C-terminal de FasL, de Fenilalanina a Leucina, por la que FasL no puede unirse a Fas.

Modificado a partir de (Nagata, 1996)

## **2.2.- Alteraciones en la expresión**

La disminución en los niveles de expresión producida por las mutaciones en *Fas* y *FasL* parece implicada en el desarrollo de ALPS, hepatitis autoinmune de tipo 2, y según algunos autores, lupus eritematoso sistémico (Drappa et al., 1996; Fisher et al., 1995; Pensati et al., 1997; Rieux-Laucat et al., 1995; Wu et al., 1996). El aumento en la expresión de *Fas* en células no linfoides provoca la destrucción de determinados tipos celulares en el tejido diana, proceso conocido como citotoxicidad mediada por *Fas/FasL*. Este sería el caso de la encefalomiелitis autoinmune experimental (Waldner et al., 1997), la esclerosis múltiple (D'Souza et al., 1996; Dowling et al., 1996), la diabetes-mellitus dependiente de insulina (Chervonsky et al., 1997; Itoh et al., 1997; Stassi et al., 1997), el tiroidismo de Hashimoto (Giordano et al., 1997), y el síndrome Sjögren primario (Kong et al., 1997). Además, las alteraciones de la expresión en linfocitos y en timocitos también tienen consecuencias. En la periferia, el aumento de expresión de *Fas* en la membrana está relacionado con la encefalomiелitis autoinmune experimental, el síndrome Sjögren primario y la esclerosis múltiple (Ichikawa et al., 1996; Mysler et al., 1994; Ohsako et al., 1994). En el timo, la acumulación anormal de células con alta expresión de *Fas* (células auto-reactivas) puede provocar miastenia *gravis* (Moulian et al., 1997).

## **3.- Implicaciones de *Fas* y *FasL* en procesos tumorales**

### **3.1.- Bases genéticas del cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades provocadas por la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y epigenéticas en los llamados genes mayores de predisposición, proto-oncogenes y genes supresores de tumores, así como en genes menores de resistencia/susceptibilidad.

#### **3.1.1.- Proto-oncogenes**

Los oncogenes constituyen las versiones activadas de los proto-oncogenes celulares mediante mutaciones dominantes de ganancia de función. Su activación se produce mediante translocaciones cromosómicas, amplificación génica o mutaciones

intragénicas que afectan a residuos cruciales para su actividad. Según la analogía utilizada por Bert Vogelstein y Kenneth W. Kinzler, un proto-oncogen mutado sería como el acelerador atascado de un coche que seguiría funcionando aunque se levantara el pie (Vogelstein and Kinzler, 2004).

### **3.1.2.- Genes supresores de tumores**

Los genes supresores de tumores participan a través de mutaciones recesivas de pérdida de función. Su inactivación se produce a través de mutaciones sin sentido en residuos clave para su actividad, mutaciones que producen una proteína trunca, deleciones o inserciones, o silenciamiento epigenético. Siguiendo con la analogía, serían como los frenos estropeados en un coche (Vogelstein and Kinzler, 2004). Aunque normalmente se precisa la inactivación de los dos alelos, se han descrito casos de haploinsuficiencia que favorecen ya el desarrollo tumoral (Balmain et al., 2003; Fodde and Smits, 2002; Santarosa and Ashworth, 2004).

### **3.1.3.- Genes de reparación**

Se podría distinguir además una tercera categoría de genes importantes en el desarrollo del cáncer: los genes de reparación. Las alteraciones de estos genes definirían una nueva “vía mutadora” (bien establecida por el equipo del Dr. Manuel Perucho en cánceres de colon) *versus* la “vía oncogénica” protagonizada por los oncogenes y genes supresores mencionados anteriormente (Yamamoto et al., 2002). Al igual que sucedía con los genes supresores, la participación de estos genes de reparación en el cáncer exigiría la inactivación de ambos alelos. Estos genes serían como los mecánicos en la analogía automovilística (Vogelstein and Kinzler, 2004).

### **3.1.4.- Genes menores de resistencia/susceptibilidad**

La susceptibilidad genética al desarrollo de un proceso tumoral viene determinada por la herencia de una combinación específica de algún gen mayor (normalmente un alelo inactivado de un gen supresor) y múltiples genes menores que constituyen el fondo o *background* responsable de la individualidad genética de los organismos. Una buena parte de los genes menores de susceptibilidad son en realidad genes modificadores,

porque son capaces de modular el fenotipo tumoral inducido por las alteraciones en los genes mayores de predisposición. El efecto modulador puede afectar tanto al desarrollo del propio proceso (resistencia/susceptibilidad), como a la gravedad del fenotipo tumoral, y/o a la respuesta a los tratamientos anti-cancerígenos. Los genes modificadores pueden ser extrínsecos (genes distintos a los mayores, es decir, no implicados directamente en el control del crecimiento celular, la proliferación o la apoptosis) o intrínsecos (polimorfismos funcionales en genes mayores de predisposición) (Fernandez-Piqueras and Santos, 2002).

Se ha demostrado que la mayoría de los cánceres esporádicos, no hereditarios, se desarrollan en individuos con predisposición genética determinada por muchos genes de efecto débil más que por un gen mutado (Demant, 2003).

### **3.2.- Polimorfismos funcionales de *Fas* y *FasL* y cáncer**

Los defectos en la regulación de la apoptosis pueden provocar multitud de enfermedades distintas, entre ellas el cáncer. De hecho, muchos genes inductores de apoptosis, incluyendo los genes objeto de este estudio, *Fas* y *FasL*, han llegado a ser considerados como posibles genes supresores de tumores (Krammer, 2000; Landowski et al., 2001; Muschen et al., 2000; Nagata, 1996). Además, hay algunos artículos que sugieren la asociación entre polimorfismos funcionales en los promotores de *Fas* y *FasL* y el riesgo de desarrollar distintas enfermedades. En el caso de *Fas*, los polimorfismos descritos en su promotor se han relacionado con el riesgo de desarrollar leucemia mieloide aguda (Sibley et al., 2003), carcinogénesis cervical (Feuk et al., 2003; Lai et al., 2003) y la enfermedad de Alzheimer (Feuk et al., 2003). En el caso de *FasL*, se ha asociado la presencia de polimorfismos en su promotor con enfermedades como el cáncer cervical (Sun et al., 2005), el lupus eritematoso (Wu et al., 2003), y el cancer de pulmón (Zhang et al., 2005).

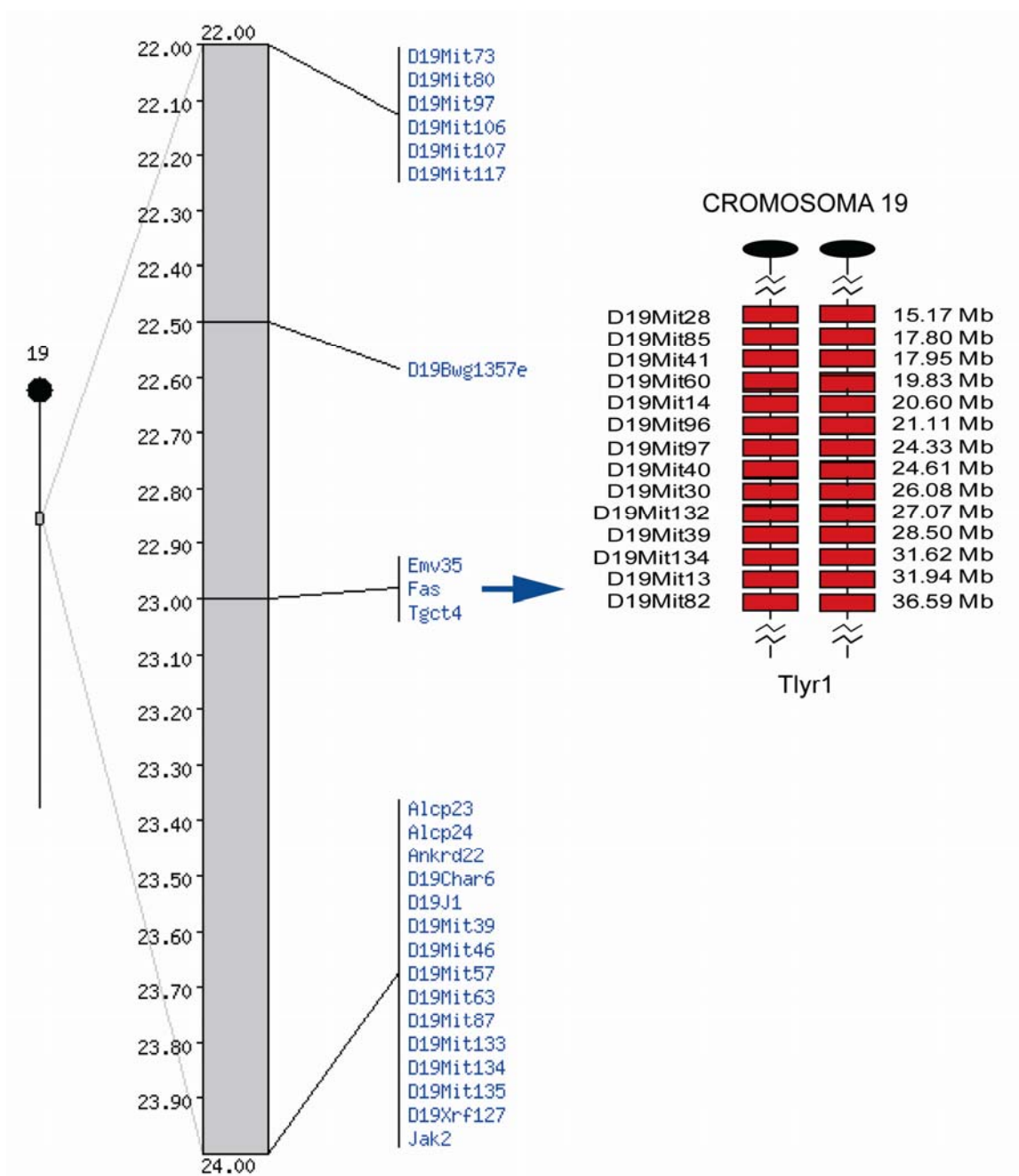


### **3.3.- Papel del sistema Fas/FasL en el desarrollo de los linfomas tímicos inducidos con rayos $\gamma$ : nuestro modelo sitúa a Fas como posible gen supresor.**

Tradicionalmente, los genes supresores de tumores se han identificado mediante la búsqueda de LOHs (*loss of heterozygosity*, pérdidas de heterocigosidad) con marcadores polimórficos de DNA en las muestras tumorales.

#### **3.3.1.- Las zonas de LOH repartidas por el genoma permiten definir genes candidatos.**

En los animales de laboratorio, la identificación de LOHs se ve dificultada por el hecho de que la mayoría de las cepas utilizadas son altamente consanguíneas, y por tanto homocigotas. Para evitar este problema, nuestro equipo buscó regiones específicas con LOH en linfomas tímicos inducidos en ratones híbridos con altas tasas de heterocigosidad. El análisis de híbridos F1 entre las cepas sensibles C57BL/6J y RF/J, permitió detectar inicialmente regiones específicas con LOHs en los cromosomas 4 (34%), 11 (2.1%), 15 (8.5%), y desbalances en el cromosoma 5 (Santos et al., 1996). Dentro del cromosoma 4 se identificaron al menos cinco regiones supresoras de linfomas tímicos (TLSR), que contenían los genes candidatos *p15<sup>INK4b</sup>*, *p16<sup>INK4a</sup>* (Malumbres et al., 1997) y *p73* (Herranz et al., 1999). En estudios posteriores, que incluía una nueva cepa de ratón (BALB/cJ), se detectó una nueva región supresora en el cromosoma 19 de ratón, en la que los genes candidatos propuestos fueron *Fas* y *Pten* (Santos et al., 2001) (Figura 4).

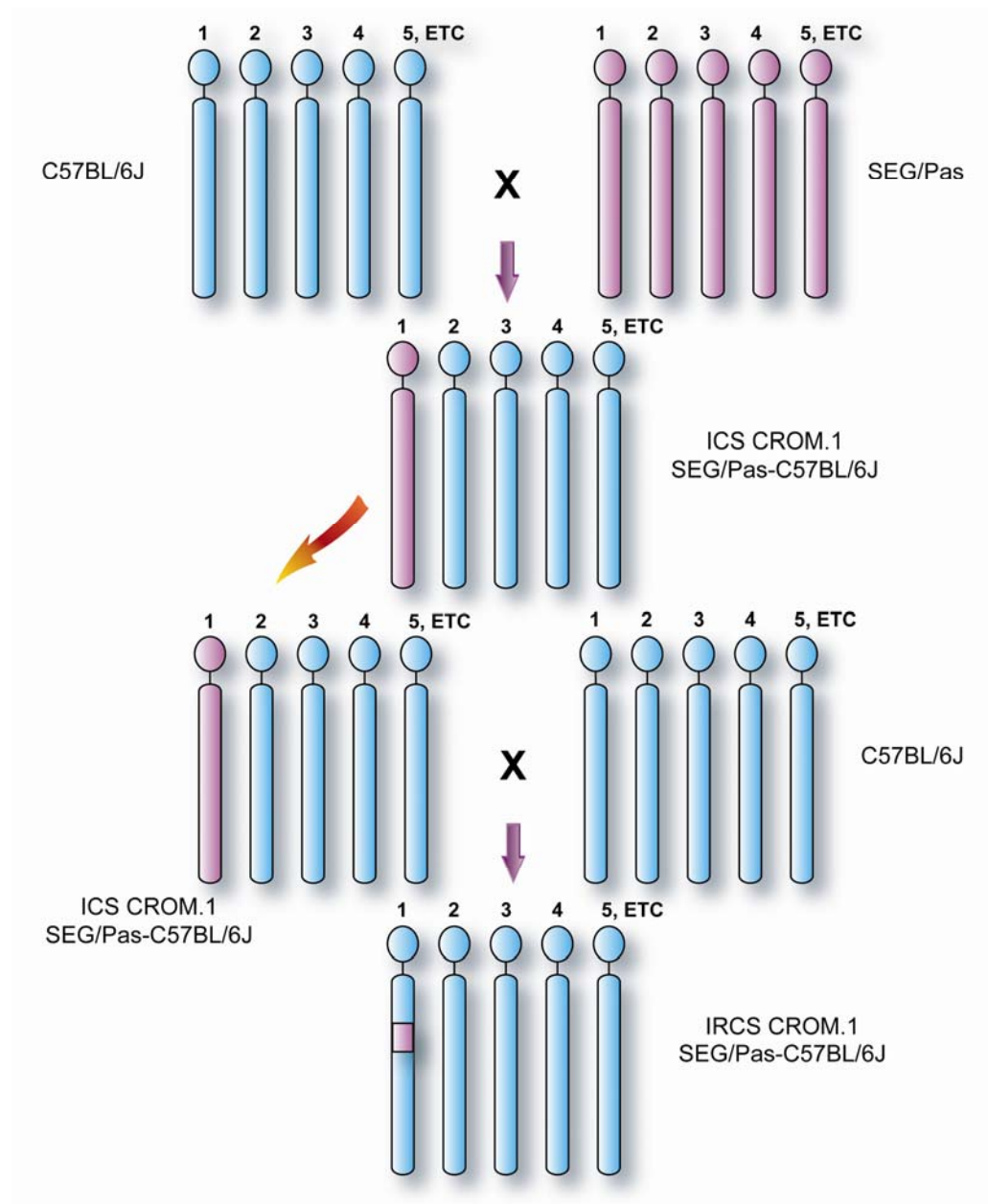


**FIGURA 4: Tlyr1 (locus de resistencia al linfoma tímico 1) identificado en el cromosoma 19 de ratón. Incluye a Fas entre los genes candidatos.**

### **3.3.2.- La utilización de cepas consómicas y congénicas sugiere que *Fas* puede comportarse como un gen de susceptibilidad al desarrollo de linfomas T murinos.**

El análisis comparativo de los niveles de incidencia de linfomas tímicos inducidos con radiación en las diferentes cepas arrojaba diferencias altamente significativas. Mientras que las cepas C57BL/6J y RF/J eran altamente sensibles (tasas de inducción más altas), las cepas SPRET/Ei y SEG/Pas eran altamente resistentes, y BALB/cJ mostraba unas tasas intermedias de incidencia tumoral. Parecía por tanto que los genomas de estas cepas se diferenciaban en el acúmulo de combinaciones diferentes de genes de resistencia/susceptibilidad. Para identificar este tipo de genes se desarrollaron cepas consómicas interespecíficas (ICS) mediante cruzamientos de individuos de la cepa resistente SEG/Pas y la cepa sensible C57BL/6J (Figura 5). El análisis de estas cepas permitió la identificación de un locus de resistencia a la inducción de linfomas tímicos (*Tlyr1*) en el cromosoma 19, justo en el intervalo que contiene tres genes candidatos: *Fas*, *Pten* y *Pdcd4* (Santos et al., 2002). Por tanto, *Fas* se sitúa de nuevo como candidato de resistencia/susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos por radiación gamma.

Un dato a favor de la participación de *Fas* en el desarrollo de los linfomas era el hecho de que la gran mayoría de los linfomas tímicos inducidos con radiación gamma (un 85.3%) expresaban niveles reducidos de *Fas*, cuando se comparaban con la expresión detectada en timos control (Santos et al., 2001).



**FIGURA 5: Generación de ICS (Cepas consómicas) e IRCS (Cepas congénicas).**

En la figura, se muestra como ejemplo la generación de una cepa consómica para el cromosoma 1 entre ratones de las cepas C57BL/6J y SEG/Pas. El individuo resultante tiene todo el fondo genético de C57BL/6J, excepto un cromosoma, que procede de SEG/Pas. Por el mismo procedimiento, se pueden obtener consómicos para los diferentes cromosomas.

A partir del consómico, por retrocruzamiento con C57BL/6J, se pueden obtener congénicos, que portan tan solo una porción de cromosoma de SEG/Pas.

# *Objetivos*

El sistema Fas/FasL está implicado en la vía extrínseca de apoptosis, y constituye un mecanismo clave en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. Se han descrito mutaciones puntuales inactivantes en estos genes que parecen ligadas a trastornos inmunológicos que cursan con propensión a algunos cánceres. Sin embargo el papel de estos genes no ha sido clarificado suficientemente en la apoptosis intra-tímica, ni tampoco se han descrito polimorfismos funcionales que pudieran modular el riesgo a padecer cánceres hematológicos, especialmente linfomas de células T. Nuestro equipo había demostrado la existencia de un locus de susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación gamma en el cromosoma 19, delimitando una región candidata que contiene el locus del receptor Fas, y había detectado niveles muy bajos de la expresión de *Fas* en este tipo de linfomas inducidos en una cepa sensible. Por todo ello, los objetivos de esta tesis eran:

1. Determinar los niveles de expresión de *Fas* y *FasL* en el timo de ratones de diferentes cepas consanguíneas con diferentes grados de susceptibilidad a la inducción, comparando los resultados obtenidos en timos control (animales no tratados) y en timos de ratones sometidos a diferentes dosis de radiación gamma, para evaluar la implicación de estos genes tanto en la respuesta de los timocitos al daño causado por la irradiación como en el desarrollo de los linfomas tímicos.
2. De confirmarse la existencia de patrones diferenciales de expresión relacionados con el grado de susceptibilidad de las cepas, el paso siguiente sería la identificación de las posibles causas, mediante el análisis comparativo de las secuencias promotoras de estos dos genes en las distintas cepas, así como la identificación de posibles polimorfismos funcionales mediante ensayos funcionales *in vitro* (luciferasa).
3. Puesto que la actividad biológica del sistema depende no solo de las cantidades relativas de ligando y receptor, sino también de la eficacia de la interacción entre ambas proteínas, el objetivo siguiente sería analizar comparativamente las secuencias codificantes de *Fas* y *FasL* en cepas con diferencias extremas de susceptibilidad, para identificar cambios nucleotídicos capaces de afectar al funcionamiento del sistema Fas/FasL. El significado funcional de esos cambios se estimaría mediante el enfrentamiento de células transfectadas con el ligando y células transfectadas con el

receptor, en combinaciones homólogas y heterólogas, valorando la capacidad de todas esas combinaciones para inducir apoptosis.

Los resultados obtenidos podrían arrojar alguna luz sobre el papel de este sistema en la determinación del riesgo genético a padecer linfomas tímicos inducidos con radiaciones ionizantes.

# *Materiales y Métodos*



## **1. Ratones**

En esta tesis se han utilizado ratones de las cepas consanguíneas C57BL/6J, RF/J, BALB/cJ, y SPRET/Ei procedentes de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones de la cepa SEG/Pas fueron proporcionados amablemente por el Dr. JL Guenet (Institute Pasteur, Paris).

Todos los procedimientos experimentales se han llevado a cabo de acuerdo con las consideraciones éticas establecidas por la Unión Europea (Directiva 86/609/CEE) para el cuidado humano y el uso de animales de laboratorio.

## **2. Tratamientos**

Cinco ratones adultos, de entre 35 y 65 días, de cada una de las cepas utilizadas permanecieron como controles, sin recibir ningún tratamiento. Otras fracciones de diez ratones de cada cepa fueron tratadas con una única dosis de 10 Gy de radiación gamma de cuerpo entero, y se sacrificaron a las 24 horas. El resto (en torno a 100 ratones de cada cepa) se sometieron a un tratamiento con radiación gamma en cuatro dosis de 1.75 Gy, una por semana. De acuerdo con resultados previos de nuestro grupo, los linfomas tímicos causados por la radiación se fueron desarrollando a intervalos regulares hasta las 25 semanas tras el tratamiento (periodo de latencia), y su caracterización se realizó siguiendo criterios ya establecidos (Santos et al., 2002). Los ratones se sacrificaron al observarse claramente los síntomas de la enfermedad: agrandamiento del bazo y los nódulos linfáticos, postura encorvada, respiración entrecortada, pelaje alborotado, o letargia. Cuando los síntomas no aparecían, los ratones se sacrificaron al finalizar el periodo de latencia de 25 semanas, y se consideraron resistentes a la inducción. Los timos con más de 100 mg tras la necropsia contenían en todos los casos una proliferación descontrolada de timocitos inmaduros y respondían a los criterios citológicos e histológicos de linfomas linfoblásticos (Newcomb et al., 1988).

## **3. RT-PCR cuantitativa a tiempo real**

El RNA total de las muestras de timo se extrajo utilizando Tripure (Roche, Mannheim, Germany). Los niveles de expresión transcripcional se cuantificaron mediante

retro-transcripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real utilizando el sistema LightCycler (Roche Diagnostic, Penzberg, Germany). Se utilizó el método de hibridación por transferencia de energía de fluorescencia-resonancia (FRET). Como control interno de la calidad del RNA y de la amplificación, se utilizó el gen que codifica la cadena beta 5 de la tubulina (*Tubb5*).

Los cebadores (*primers*) y las sondas utilizados para *Fas*, *FasL* y *Tubb5* fueron los siguientes:

Fas-F: 5'-CGCCCGCTGTTTTCCCTT-3'

Fas-R: 5'-AGCAAAATGGGCCTCCTTG-3'

Fas-FL: 5'-TTAACTGTGAGCCAGCAAGCACCAGA--FL-3'

Fas-LC: 5'- LC Red705-CAGGACAGCCCAGATCCACAGCAT--PH-3'

FasL-S: 5'-TGGAATGGGATTAGGAATGTAT-3'

FasL-R: 5'-GTGTACTGGGGTTGGCTATT-3'

FasL-FL: 5'-TGAACCTCACGGAGTTCTGCCAG--FL-3'

FasL-LC: 5'-LC Red640-TCCTTCTGCAGGTGGAAGAGCTG--PH-3'

Tubb5-F: 5'-TGGGACTATGGACTCCGTTC-3'

Tubb5-R: 5'-GTGGGTCAGCTGAAAGCCT-3'

Tubb5-A: 5'-AAAGCCTTGCAGGCAATCA-3'

Tubb5-FL: 5'-GGCCTTTAGCCCAGTTGTTGCCT--FL-3'

Tubb5-LC: 5'- LC Red705-CCCCAGACTGACCGAAAACGAAGTT--PH-3'

Las sondas de hibridación fueron diseñadas por TibMolBiol (Berlin, Germany).

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un solo paso utilizando el kit *one-step LightCycler* (Roche). Se utilizaron 200 ó 400 nanogramos de RNA total de cada muestra de timo para generar cDNA, en una reacción que contiene 3.25 mM de  $Mn(OAc)_2$ , 0.5  $\mu M$  de cada cebador, 0.2  $\mu M$  de cada sonda, y 1x de la solución LC RNA Master Hybridization Probes mix (Roche).

Los cDNA de *Fas* y *Tubb5* o bien de *FasL* y *Tubb5* se co-amplificaron a continuación en las siguientes condiciones de PCR: 2 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, y 15 segundos a 72°C.

Todas las reacciones de PCR se repitieron 3 veces para cada muestra, en dos experimentos independientes. Los niveles de expresión de *Fas* y de *FasL* se calcularon utilizando el programa *LightCycler Relative Quantification software* (Roche).

#### 4. Genotipado de los promotores de *Fas* de ratón

El DNA de las células del timo se extrajo utilizando el reactivo DNAzol (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH).

Se diseñaron tres parejas de cebadores solapantes, para la amplificación por PCR de los promotores de las cepas C57BL/6J, RF/J, BALB/cJ, SPRET/Ei y SEG/Pas, utilizando la secuencia del promotor de *Fas* de la cepa 129/svJ, publicada en 2001 (Zheng et al., 2001) (Número de acceso a GenBank AY027814):

FasProm1-F: 5'TGTTGGCATGTAGGGATGAA 3'

FasProm1-R: 5'AAATAGGTAGTTATGATGGGAAGATCA 3'

FasProm2-F: 5'TGATCTTCCCATCATAACTACCTATTT 3'

FasProm2-R: 5'ACTTTGGCTGATTGCTGGAG 3'

FasProm3-F: 5'GGCAAATGGTCTTTGTCTC 3'

FasProm3-R: 5'GTCTGCAGCAAGGGAAAACA 3'

Con estas parejas se amplificaron tres fragmentos de 415, 426 y 495 bp, respectivamente, que comprendían desde el nucleótido –1272 hasta el sitio de inicio de la traducción (no incluido).

Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1%, con bromuro de etidio como agente intercalante para la detección de las bandas con luz ultravioleta. El DNA extraído de las bandas de agarosa se purificó utilizando el *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Germany), y se envió para su secuenciación.

#### 5. Genotipado de los promotores de *FasL* de ratón

Para amplificar y clonar el promotor de *FasL* de las cepas C57BL/6J y SEG/Pas, se diseñaron una pareja de cebadores que contenían dos sitios distintos de restricción, para *Kpn* I y *Xho* I (subrayados), utilizando como base la secuencia publicada del promotor de *FasL* de *Mus musculus* (Zhang et al., 2000) (Número de acceso a Genbank AF045739):

FasLPromK-F: 5' GGTACCCAAACTCTTCTGAATTAGGCA 3'

FasLPromX-R: 5' CTCGAGTAATTCATGGGCTGCTGCAT 3'

La amplificación de la secuencia correspondiente (que comprende los nucleótidos -706 a +20) se realizó con el sistema Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostic). Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio. El DNA de las bandas se purificó con el QIAquick *Gel Extraction Kit* (Qiagen), y los fragmentos de DNA se secuenciaron.

## 6. Genotipado de los cDNA de ratón de Fas y FasL

La extracción de RNA se realizó con el reactivo Tripure (Roche), a partir de muestras de hígado (para Fas) o de testículo (para FasL) de ratones de las cepas C57BL/6J y SEG/Pas. Utilizando como base las secuencias previamente publicadas para los cDNA de Fas y de FasL (Números de acceso a GenBank: NM\_007987 y NM\_010177, respectivamente), se diseñaron parejas de cebadores que contenían dos sitios de restricción distintos, para *Hind* III y *Bam*HI en el caso de Fas, y para *Mlu* I y *Nhe* I en el caso de FasL. Estos cebadores se usaron tanto para amplificar las secuencias correspondientes a los cDNA de cada cepa, como para su clonaje posterior en el vector pcDNA3 (Invitrogen). Las secuencias de estos cebadores son las siguientes (sitios de restricción subrayados):

FasHind-F: 5' GCAAGCTTTTTTCCCTTGCTGCAGACATG 3'

FasBam-R: 5' GCTGGATCCGAGGTAGTTTTCACTCCAGAC 3'

FasLMlu-F: 5' AGTACGCGTCAGAGTTCTGTCCTTGACACC 3'

FasLNhe-R: 5' GATGCTAGCATTAAGGACCACTCCATGGACC 3'

La RT-PCR se llevó a cabo en dos pasos. En primer lugar, la transcripción inversa se realizó utilizando el sistema SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). A continuación, la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con el Expand High Fidelity PCR System (Roche) y los cebadores mencionados arriba.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, el DNA de las bandas correspondientes se purificó utilizando el

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), y los fragmentos de DNA fueron enviados para su secuenciación.

## **7. Secuenciación de DNA y comparación entre secuencias**

Todas las reacciones de secuenciación automática se han llevado a cabo en el servicio correspondiente del CNIO utilizando el sistema ABI Prism (Applied Biosystems) de terminadores fluorescentes Big Dye™ y el instrumento de electroforesis multicapilar ABI 3730. Las comparaciones entre secuencias se han hecho con el programa L-Align de ExPASy Molecular Biology Server.

## **8. Clonaje del promotor de Fas y construcciones para los ensayos de luciferasa**

Para clonar el promotor de *Fas* se diseñó una nueva pareja de cebadores con dos sitios distintos de restricción, para *Kpn* I y *Xho* I (subrayados), que no existen dentro del promotor pero están incluidos en el sitio de multiclonaje del plásmido de luciferasa pGL2-Basic (Promega, Madison, WI):

FasPromKX-F: 5'ATCTTCCGGTACCAAAGATGTTGGCAT 3'

FasPromKX-R: 5'ATGTCTGCAGCTCGAGAAAACAGCG 3'

Con estos cebadores se amplificó el promotor de *Fas* y parte del exón 1, desde el nucleótido –1272 al sitio de inicio de la traducción, utilizando el Expand High Fidelity PCR System (Roche). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, purificados con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), digeridos doblemente con *Kpn* I y *Xho* I (Roche), y clonados en el plásmido pGL2-Basic (Promega).

## **9. Clonaje del promotor de *FasL* y construcciones para los ensayos luciferasa**

Los fragmentos de DNA que contienen el promotor de *FasL* de las distintas cepas, amplificados y purificados como se indicó en un epígrafe anterior, se ligaron durante una noche a 4°C con la secuencia del vector pGEM-T Easy (Promega), utilizando el tampón 2× Rapid Ligation Buffer, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de transformación se llevaron a cabo utilizando las bacterias JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega). Las recombinantes positivas se analizaron y seleccionaron mediante exploración del color (colonias blancas-azules), digestión doble con *Kpn* I y *Xho* I (Roche), y secuenciación. Finalmente, los fragmentos seleccionados y digeridos con *Kpn* I y *Xho* I se clonaron en el plásmido de luciferasa pGL2-Basic (Promega).

## **10. Clonaje de los cDNA de *Fas* y *FasL***

Los fragmentos de cDNA de *Fas* obtenidos como se describe en apartados anteriores, se sometieron a una digestión doble con *Hind* III y *Bam*H I (Roche) y se clonaron en el vector pcDNA3 plasmid (Invitrogen).

Los fragmentos purificados con el cDNA de *FasL* se clonaron en el vector pGEM-T Easy Vector (Promega) como se ha descrito previamente. Los clones seleccionados se sometieron a digestión doble con *Mlu* I y *Nhe* I (Roche), se clonaron inicialmente en el vector pBI-EGFP (CLONTECH Laboratories, Inc.), y se subclonaron mediante digestión doble con *Bam*H I and *Eco*R V en el vector pcDNA3 (Invitrogen).

## **11. Cultivos celulares y transfecciones**

Las células T Jurkat se cultivaron en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 µg/ml), estreptomycin (100 U/ml), HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) (10 mM), L-glutamina (2 mM) (todos de Gibco, Carlsbad, CA), piruvato sódico (1 mM) y aminoácidos no esenciales 1× (ambos de Biowhittaker, Cambrex Corporation, East Rutherford, New Jersey).

Las células HEK-293T se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10% FBS, L-glutamina (2 mM) (todos de Gibco), ampicilina (0.1 mg/ml) (Roche), gentamicina (64 µg/ml) y fungizona (anfotericina B) (2.5 µg/ml) (Sigma St. Louis, Missouri).

Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en el caso de las células Jurkat, y el reactivo Lipofectamine Reagent (Invitrogen) para las células HEK-293T.

## **12. Ensayos de Promotor: actividad Luciferasa**

Se realizaron utilizando como sustrato las células Jurkat. Veinticuatro horas después de la transfección con las construcciones correspondientes (promotor de *Fas* o de *FasL* derivado de cada cepa de ratón), las células fueron sometidas a un tratamiento con PMA (100 ng/ml)/Ionóforo de calcio (1 µM) (ambos de Sigma) durante 6 horas, o con 10 Gy de radiación gamma (en una concentración de  $10^6$  células/ml PBS) durante 10 horas, tras lo cual se ensayó la actividad luciferasa de las células utilizando el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Para normalizar los resultados, en todos los casos se co-transfectó el vector pRL-tk Renilla Normalizing Luciferase Vector (Promega) con la construcción del pGL2 correspondiente. Ambas actividades luciferasa (*Firefly* y *Renilla*) se monitorizaron en un luminómetro Sirius (Berthold, Germany).

## **13. Ensayos de apoptosis**

Para estar seguros de la funcionalidad de todas las construcciones y comprobar si se producían en todos los casos cantidades similares de transcritos, se determinaron mediante RT-PCR los niveles de expresión de ambos genes en las células HEK-293T humanas transfectadas con las construcciones que contienen la secuencia codificante de *Fas* o de *FasL* procedentes de C57BL/6J o SEG/Pas.

A las 24 horas de la transfección con *Fas* y *FasL*, se combinaron  $5 \times 10^3$  células de cada tipo en placas de 96 pocillos, de forma efector-diana, para posteriormente medir los niveles de activación de la caspasa-8. Las combinaciones fueron las siguientes:

C57BL/6J-Fas / C57BL/6J-FasL

SEG/Pas-Fas / SEG/Pas-FasL

C57BL/6J-Fas / SEG/Pas-FasL

SEG/Pas-Fas / C57BL/6J-FasL

Ocho horas después de iniciado el enfrentamiento entre los dos tipos de células (efectoras y dianas) se determinó la actividad caspasa-8, acoplada a la actividad luciferasa, utilizando el Caspase-Glo 8 Assay (Promega) según las indicaciones del fabricante. El tiempo óptimo de incubación con el Caspase-Glo 8 Reagent fue estimado en 30 minutos. La actividad luciferasa se monitorizó en un luminómetro Micro Lumat Plus Microplate Luminometer LB 96 V (Berthold).

#### **14. Western Blots**

La activación de las caspasas-8 y 3 fue analizada también mediante *Western Blotting*. Para ello se obtuvieron extractos proteicos a partir de células transfectadas y combinadas de la misma manera que para el ensayo Caspase-Glo 8 Assay (Promega), con el tampón de extracción de proteínas totales RIPA Cell Lysis Buffer (100 mM NaCl; 50 mM, pH 7.4, Tris-HCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5% Ácido deoxicólico; 0.1% sodium dodecyl sulfate; y Triton X-100), suplementado con 1 mM PMSF y las cantidades recomendadas de los inhibidores Protease Inhibitor Cocktail and Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Roche).

Mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante) al 15%, se separaron alícuotas de 30 µg de los lisados proteicos. Posteriormente, se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa pura (Bio-Rad, Hercules, CA) durante 1 hora y 30 minutos a 4°C. Para la inmunodetección de las caspasas-8 y 3, se utilizaron los anticuerpos siguientes:

- Anticuerpo monoclonal anti-ratón contra la caspasa-8: 1C12 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- Anticuerpo policlonal anti-ratón contra la caspasa-3: H-277:sc-7148 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Como control de carga, se utilizó la  $\alpha$ -tubulina, detectable con el anticuerpo monoclonal DM 1A (Sigma). Se utilizaron los anticuerpos secundarios correspondientes,



acoplados a la peroxidasa del rábano (*horseradish peroxidase*), y el revelado se hizo mediante el método Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Substrate (Roche).

## **15. Métodos estadísticos**

Para comprobar que los grupos de datos se ajustaban a la normalidad, se empleó el *test* de Kolmogorov-Smirnov, y para comprobar la homogeneidad de las varianzas, se utilizó el *test* de Levene.

La significación estadística de los resultados se determinó utilizando un *test one-way* ANOVA, seguido de una comparación *post-test* Tukey.

Todos los *tests* estadísticos se han llevado a cabo utilizando el software SPSS (SPSS Inc., version 12.0, Chicago, IL).

# *Resultados*

## 1.- Animales y tratamientos.

Se han utilizado grupos de treinta individuos pertenecientes a las cepas consanguíneas C57BL/6J, RF/J, BALB/cJ, SPRET/Ei y SEG/Pas. Tres de ellas (C57BL/6J, RF/J y BALB/cJ) derivan del complejo específico *Mus musculus*, mientras que SPRET/Ei y SEG/Pas del de *Mus spretus*. La elección de estas cepas se basó en el hecho de que ninguna de estas cepas desarrolla tumores espontáneos, pero existen grandes diferencias entre ellas en cuanto a su grado de susceptibilidad al desarrollo de diversos tipos de cánceres inducidos con agentes físicos y químicos (Dragani et al., 1995; Manenti et al., 1995; Mao et al., 2006; Marin et al., 1999; Nagase et al., 1996; Nagase et al., 1999; Nagase et al., 2003; Nagase et al., 2001; To et al., 2006). Concretamente, estas cepas difieren significativamente en sus grados de susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación- $\gamma$  (Santos et al., 2002). Con unas condiciones de tratamiento similares a las utilizadas en esta tesis las cepas C57BL/6J y RF/J muestran una incidencia global de tumores en torno al 73.4% (Santos et al., 1996); las cepas SPRET/Ei y SEG/Pas son extremadamente resistentes, con una incidencia de tumores en torno al 3% (Santos et al., 2002); y la cepa BALB/cJ muestra una incidencia de tumores intermedia, en torno al 60% (Melendez et al., 1999).

Para realizar todos los análisis previstos, se seleccionaron:

- 1.- Un subgrupo de 5 ratones de cada cepa que no fueron sometidos a ningún tratamiento, y constituirían los controles correspondientes.
- 2.- Otro subgrupo de otros 10 ratones de cada cepa, que se trataron con una dosis única de radiación gamma (10 Gy) que denominamos dosis letal.
- 3.- Un tercer subgrupo de 100 ratones de cada cepa, que se sometieron a 4 dosis de 1.75 Gy (dosis subletal), administradas una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas.

Los ratones tratados con la dosis letal fueron sacrificados a las 24 horas para determinar los efectos inmediatos de la radiación, que en buena medida podrían constituir la respuesta defensiva de las células. Por otro lado, los sometidos al tratamiento fraccionado con dosis subletal fueron observados durante un periodo de latencia de 25 semanas, ya que, según lo publicado, hasta un 90% de los animales sometidos a dicho tratamiento desarrollan linfoma de células T dentro de un período de entre 3 y 6 meses (Guerrero and Pellicer, 1987).

En este último caso el análisis de las muestras tímicas nos permitiría identificar las alteraciones genéticas que persisten al final del proceso, que serán presumiblemente las necesarias para el desarrollo de las etapas finales y el mantenimiento del fenotipo tumoral.

## **2.- El análisis transcripcional de *Fas* sugiere su implicación en la linfomagénesis tímica.**

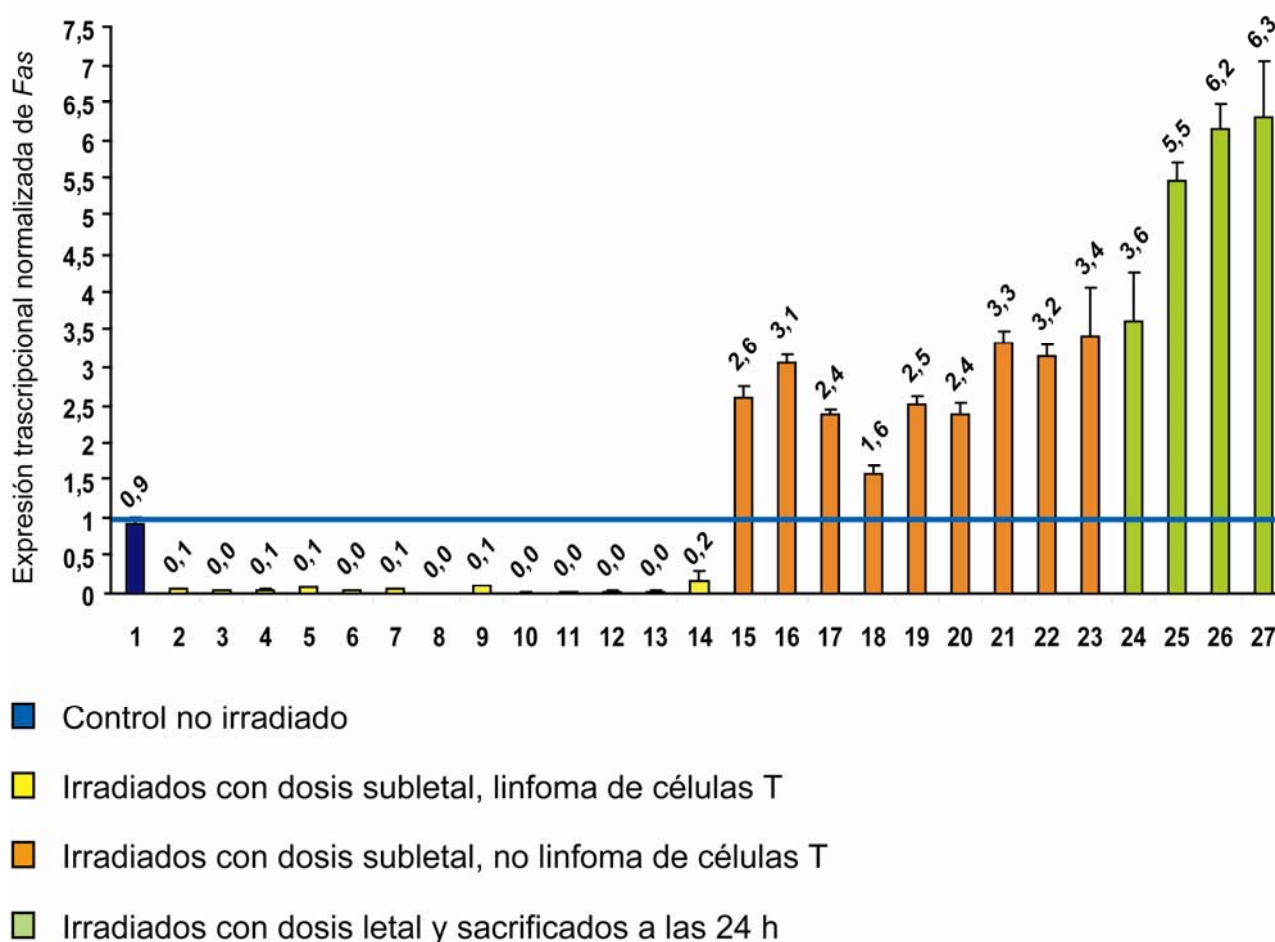
Los niveles de expresión transcripcional de *Fas* se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) en muestras tímicas extraídas directamente de los animales (*in vivo*), puesto que este procedimiento garantiza unos niveles de sensibilidad suficientes para encontrar diferencias incluso sutiles entre los niveles de expresión de las diferentes cepas o condiciones de tratamiento. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, los análisis se efectuaron inicialmente en muestras tímicas de ratones de la cepa C57BL/6J con las siguientes características:

- No tratados.
- Tratados con dosis letal (1 dosis de 10 Gy) y sacrificados para el análisis tras 24 horas.
- Tratados con dosis subletal (4 dosis de 1.75 Gy) que no desarrollaron linfoma tímico durante el período de latencia de 25 semanas.
- Tratados con dosis subletales que desarrollaron linfoma tímico durante el período de latencia de 25 semanas.

Los resultados demostraron un nivel basal de expresión claro en los ratones control, pero la expresión del gen *Fas* era prácticamente nula en el 100% de los ratones con linfoma tímico (13/13, con unos niveles de expresión normalizados que oscilaban entre 0.0 y 0.1). Curiosamente, los niveles de expresión aumentaron considerablemente tanto en los timos de ratones tratados con dosis letal (niveles que varían entre 1.5 y 3.4) como en los tratados con dosis subletal que no llegaron a desarrollar tumor después del correspondiente periodo de latencia (valores que fluctúan entre 3.6 y 6.3) (Figura 6).

Parece, por tanto, que la radiación- $\gamma$  activa de alguna manera la expresión *in vivo* del gen *Fas* dentro del timo, posiblemente como parte de una respuesta defensiva de los timocitos dañados (iniciación de la linfomagénesis). Por otro lado, el hecho de que la expresión disminuyera hasta hacerse prácticamente nula en los linfomas tímicos y sin

embargo esté aumentada en los individuos que se resistieron al desarrollo del tumor, sugiere que el gen debe estar además implicado en la progresión de la linfomagénesis, o el mantenimiento del estado tumoral, y corrobora la idea ampliamente extendida de que *Fas* puede ser considerado como un gen supresor de tumores (Chan et al., 1999; Krammer, 2000; Muschen et al., 2000; Nagata, 1996).



**FIGURA 6: Expresión transcripcional normalizada de *Fas* en timos de ratones C57BL/6J tratados con radiación gamma.**

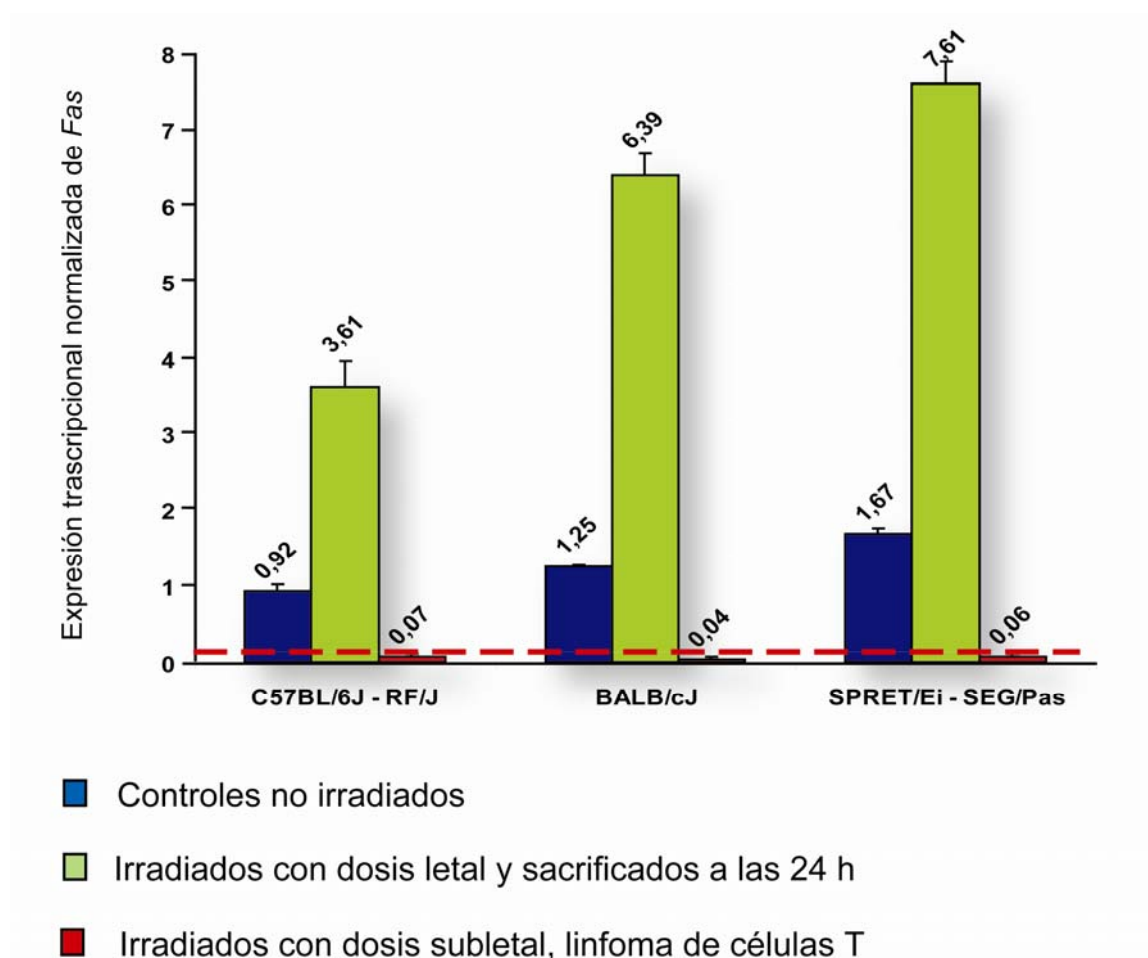
Los datos son la media de dos experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado.

### **3.- Análisis comparativo de los patrones de expresión transcripcional de *Fas* en las diferentes cepas de ratón con diferente susceptibilidad tumoral.**

La comparación entre los patrones de expresión basal de *Fas* en el timo de ratones controles de las distintas cepas permitió su clasificación en tres grupos, que coincidían perfectamente con las que exhiben distintos grados de susceptibilidad al desarrollo de los linfomas tímicos (RITL) (Figura 7). Por un lado, el grupo de SPRET/Ei y SEG/Pas, donde los ratones mostraron los mayores niveles de expresión transcripcional (media normalizada 1.6740, S.E. 0.03295); por otro lado, el grupo formado por las cepas C57BL/6J y RF/J que mostraron los niveles más bajos de expresión (media 0.9240, S.E. 0.03906); y, finalmente, la cepa BALB/cJ que mostró unos niveles intermedios de expresión (media 1.2480, S.E. 0.009695).

Cuando los análisis comparativos se hacían con muestras tímicas de ratones tratados con dosis letal, se observó, por un lado, un incremento considerable con respecto al nivel basal, y por otro lado el mantenimiento de las diferencias significativas comentadas entre los grupos de cepas. Una vez más, el grupo SPRET/Ei y SEG/Pas mostró los niveles de expresión más altos (media normalizada 7.61, S.E. 0.2740), el grupo C57BL/6J y RF/J los niveles más bajos (media 3.61, S.E. 0.3527), y BALB/cJ los niveles intermedios (media 6.39, S.E. 0.2979 ).

En el caso de ratones tratados con las 4 dosis subletales de radiación que llegaron a desarrollar linfomas tímicos, los niveles de expresión de *Fas* fueron siempre extremadamente bajos, sin que existieran diferencias significativas entre grupos (grupo SPRET/Ei: media 0.06 SE. 0.0439; grupo BALB/cJ: media 0.04 SE. 0.0296; grupo C57BL/6J: media 0.07 SE. 0.0345).



**FIGURA 7: Expresión transcripcional normalizada de *Fas* en timos de diferentes cepas de ratón, con distinta susceptibilidad genética al desarrollo de linfomas linfoblásticos de células T inducidos por radiación gamma.**

Los datos son la media de dos experimentos independientes, cada uno por triplicado. Las diferencias son significativas entre todos los grupos ( $P < 0.001$ ), excepto en el caso de los linfomas de células T, cuya expresión no es significativamente distinta entre las dos cepas.

#### **4.- Existen numerosos cambios de nucleótidos en los promotores de Fas que permiten diferenciar entre las cepas de ratón.**

Para determinar si las diferencias encontradas en los niveles de expresión de *Fas* pueden atribuirse a variaciones en la región promotora, se secuenciaron las regiones promotoras de este gen en todas las cepas. Los resultados quedaron depositados en la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: C57BL/6J: DQ003592; BALB/cJ: DQ003593; RF/J: DQ003594; SPRET/Ei: DQ003597; SEG/Pas: DQ003598. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia previamente publicada, correspondiente a la cepa 129/svJ (Zheng et al., 2001).

Las secuencias promotoras de C57BL/6J y RF/J se demostraron/fueron idénticas a la de 129/svJ, mientras que las demás cepas presentaron un número considerable de variaciones, que permitieron la clasificación de las cepas según el haplotipo de sus secuencias promotoras en los mismos tres grupos que se habían establecido previamente en base al análisis de sus niveles de expresión: (1) C57BL/6J y RF/J, (2) BALB/cJ, y (3) SPRET/Ei y SEG/Pas (Figura 8).

El mayor número de cambios nucleotídicos se detectó en las cepas SPRET/Ei y SEG/Pas, cuyos promotores presentaron un total de 26 variaciones (sustituciones, inserciones o deleciones) en comparación con la secuencia promotora de la cepa C57BL/6J.

Utilizando el haplotipo del grupo C57BL/6J como referencia, el promotor de BALB/cJ tiene una sustitución de nucleótido especialmente llamativa dentro del sitio de unión del factor de transcripción AP1 (-375 A/G), mientras que el promotor del grupo de SPRET/Ei tiene dos variantes principales que afectan a los sitios de unión de los factores de transcripción NF-AT (-964C/T) y NF- $\kappa$ B (-598Ins. C).



-1272	C57BL/6J TGTGGCATGTAGGGATGAAGGCTCTATGTAGGCACCTTTCTTCTGCTCTCAACTTCTCTATATTCAATGAGTTGTGTGG SPRET/Ei ..... BALB/cJ .....
-1192	C57BL/6J GTCTCAGTTTGTGGGAGCAATCTATAGTCTTGGCAACAGGCTGCATTGTTTGGGACTCCCATGCAACTCTTTTGGCC SPRET/Ei ..... BALB/cJ ..... NF-kB
-1112	C57BL/6J AACGATTCAATTAGATGCAACCCCATCCAGGAAAGGAAACTTCATTGATGACAAGAGATGTTCACTTGTGGCTCTGTC SPRET/Ei ...A..... BALB/cJ ..... NF-AT
-1032	C57BL/6J TCCCCCATTATTTGGCTATAGATCACCTTCATGTATGCTTATACTTTAGGAAGACTCTGCTAGGTTTCCATACCTCTCA SPRET/Ei .....A.....T..... BALB/cJ ..... NF-AT*
-952	C57BL/6J AATGCCCTTTAATTTTAGCTGTCTCTCCCTGTATTCCCATTCATCGTCTTCCTTTCCCTCCCTCACTTGATCTTCCCAT SPRET/Ei .....TT.....G..T..... BALB/cJ .....
-872	C57BL/6J CATAACTACCTATTTTATCTCTCTCCTTAATAAGATCTTTCTGTCCCTCCCTAGTCCCTTACTCTATATCTAACCCC SPRET/Ei .....A.....C..... BALB/cJ .....
-792	C57BL/6J CGTGGTTCTAAAGATTCTGGCTTGGTCCCTGAGTTAACTGCTGTGTTATTTGTCATAGTCATTACCTTCATTCTCCATT SPRET/Ei ..A..... BALB/cJ ..... AP-1
-712	C57BL/6J TGGGAAACGAAGCCAAGGACATTCCTTCATCAGGATCCCAAAGCCTATTATCTCTACCTCTGCTGTGGTGATTGTCAC SPRET/Ei .....G.....G..... BALB/cJ ..... NFkB
-632	C57BL/6J TTCATGTATCATATATGAGCTCTGTGGAAGGACC-TCCCTCATCAGAATCCTAGGGTGTGTACCTCCTCTGTGGTAATTA SPRET/Ei .....C.....A..... BALB/cJ ..... NFkB*
-552	C57BL/6J CCATTTCAGAGGCCCGAGAGCCCGAGCAGACCTGTCTACTGACAAATATTGAAAGTGAAGGCAAAA-TGGTCTTTGTCTC SPRET/Ei .T.....A..... BALB/cJ ..... AP-1
-472	C57BL/6J CAGCAATCAGCCAAAGTCCAATTCAATACAGAGTTCAGAATTCCTTCCAGGGTGAGCAGCAGGCAGAAAAAAATCTCA SPRET/Ei ..... BALB/cJ .....
-392	C57BL/6J CTTGACCTGAGGGTGTGACTGTGGAAGCGCCCGAGATGGGGAATGCCCATTTATGCAATCAAGCCCTGCTTGGGCCCCCT SPRET/Ei .....G..... BALB/cJ ..... AP-1* NFkB
-312	C57BL/6J CCTCCCCGCCCCCACCACCCCGCTCAGGCCGCTGTGCAGTGGTGAGTCAGTGGGTTTCCCCGGGAGACCAGCAG SPRET/Ei ..... BALB/cJ ..... NFkB
-232	C57BL/6J AACTTTCTCGCAACCCTTGGGGCTTTACGAAGATTGTGTTTGGTCCCTCAAAGAAAAA---GTGACATACACGTGTT SPRET/Ei ....C..T.....A.....AAA..... BALB/cJ .....
-152	C57BL/6J CAAAGCGATTCTGGGAAGACCTGAATAGGAGCGAAGCGGTTTGTGCGTGCCAGGGGGCGGGCCTAGGCAAAGTACATAC SPRET/Ei .....A..G.....T..... BALB/cJ .....
-72	C57BL/6J CCACAGGCAGTCTAGAGCTGGTGGGTGGGGCCGAGGCTGCCACACAGGCCGCCCGCTGTTTCCCTTGCTGCAGACATG SPRET/Ei ...G..... BALB/cJ ...G.....

**FIGURA 8: Promotor de Fas, de las cepas C57BL/6J, SPRET/Ei y BALB/cJ.**

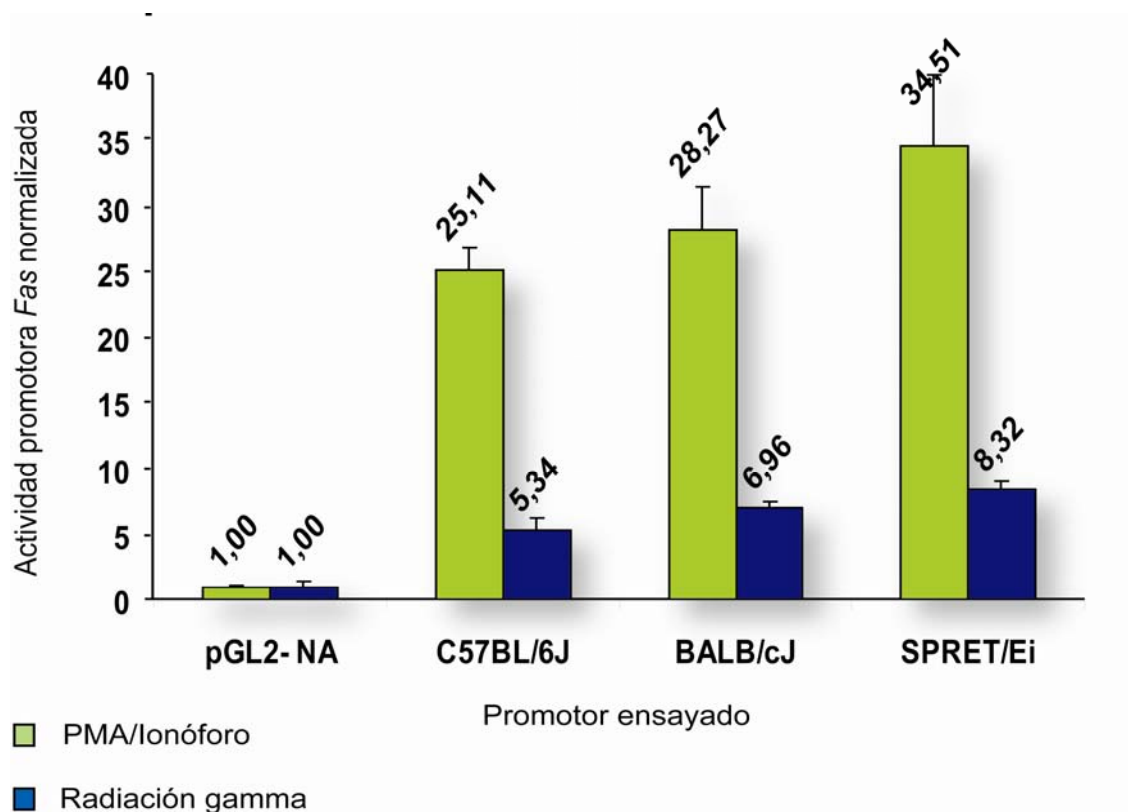
Los promotores de RF/J y SEG/Pas son 100% idénticos a los de C57BL/6J y SPRET/Ei, respectivamente. Los números a la izquierda indican la posición del nucleótido desde el sitio de inicio de la transcripción. Los puntos indican identidad en la secuencia, y los polimorfismos se indican con el correspondiente nucleótido. Los sitios de unión de factores de transcripción están subrayados, y su nombre indicado encima de la secuencia. Los polimorfismos situados en sitios de unión de factores de transcripción están marcados con un asterisco.

## **5.- Los cambios nucleotídicos encontrados en los promotores de *Fas* constituyen polimorfismos funcionales que afectan a los niveles de expresión transcripcional.**

Una vez encontradas las diferencias mencionadas en la secuencia de DNA de los promotores en las distintas cepas, se decidió estudiar la posible funcionalidad de estas variantes (haplotipos) mediante ensayos de actividad promotora, basados en medir la actividad luciferasa dirigida por el promotor de *Fas* derivado de los tres haplotipos diferentes en células Jurkat activadas con PMA/Ionóforo. Sin embargo, dado que nuestro modelo *in vivo* consiste en la inducción de linfomas tímicos con radiación- $\gamma$ , también se determinaron los niveles de actividad luciferasa tras la activación del promotor de *Fas* con una dosis única de radiación- $\gamma$ . Se utilizó la dosis de 10 Gy, por su capacidad demostrada de inducir apoptosis (Maas et al., 2005). Para establecer el tiempo óptimo de incubación, la actividad luciferasa se midió en células tratadas con 10 Gy de radiación- $\gamma$  e incubadas durante 4, 6, 8, 10 y 24 horas, comprobándose que la activación era máxima a las 10 horas.

En el caso de la activación con PMA/Ionóforo, los promotores de *Fas* de C57BL/6J y RF/J dirigieron la transcripción del gen de la luciferasa hasta un aumento de 25.11 veces con respecto al vector vacío en células no tratadas (pGL2-NA). En el caso de la activación con radiación  $\gamma$ , el incremento fue de 5.34 veces (Figura 9). Por otro lado, los promotores de SPRET/Ei y SEG/Pas produjeron valores de actividad luciferasa de 34.51 veces sobre el pGL2-NA para células activadas con PMA/Ionóforo, y de 8.32 veces en células activadas con radiación  $\gamma$ . Finalmente, el promotor de BALB/cJ dirigió una actividad luciferasa intermedia entre ambos grupos, con un aumento sobre el vector vacío de 28.27 veces tras la activación con PMA/Ionóforo, y de 6.96 veces tras la  $\gamma$ -irradiación.

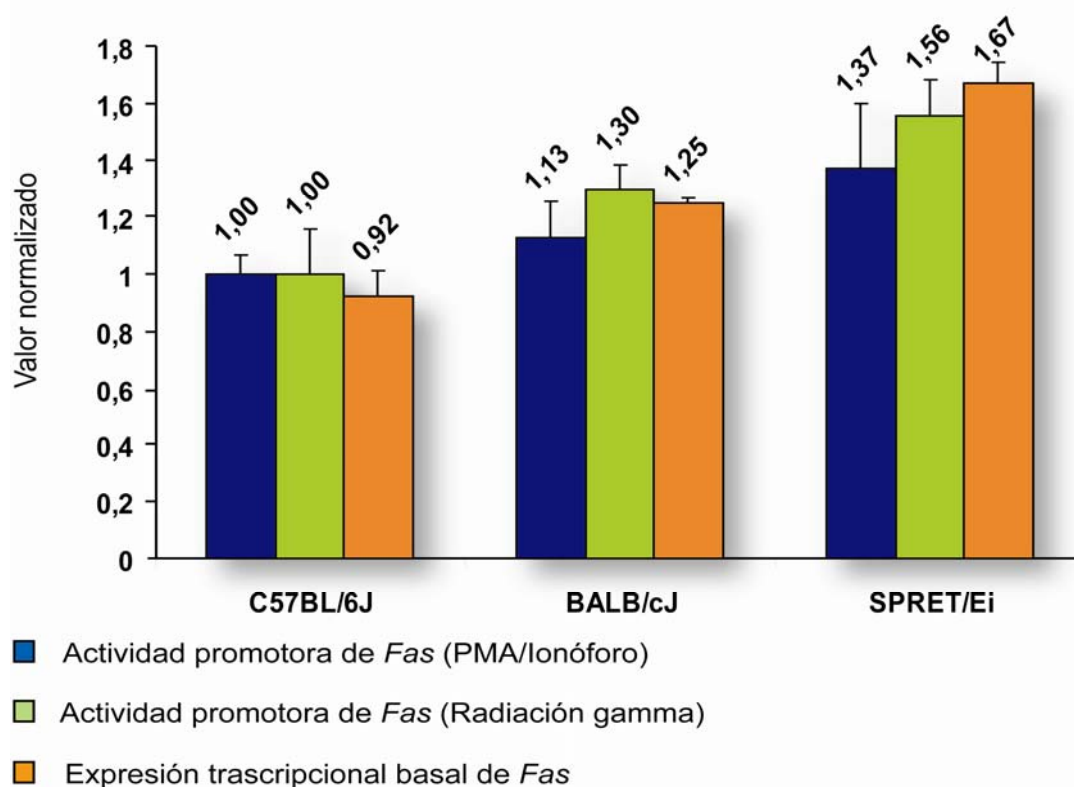
La validez de estos resultados se apoya en el hecho de que en todos los casos la actividad promotora superó al menos en dos veces a la actividad del plásmido vacío (Hoogendoorn et al., 2003).



**FIGURA 9: Actividad promotora de Fas en células T Jurkat activadas.**

El incremento de actividad (fold increase) se calcula como la razón [Actividad reportera normalizada de cada promotor en células activadas / Actividad reportera normalizada del pGL2 vacío en células no activadas] (pGL2-NA). La actividad reportera normalizada se calcula como la razón [Valor de luciferasa / Valor de renilla]. Las células JK se trataron bien con PMA/Ionóforo o con Radiación gamma. Los datos son la media de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Todas las diferencias son significativas (PMA/Ionóforo:  $p=0,007$  y  $\gamma$ -Irradiación:  $p=0,005$ ).

Para facilitar las comparaciones y la exposición gráfica de los resultados, se han utilizado también las actividades normalizadas de cada promotor [Unidades relativas de luminiscencia (RLU) de luciferasa / RLU de Renilla] referidas a la actividad normalizada del promotor de C57BL/6J (Figura 10). Resulta especialmente interesante el hecho de que haya una clara correlación entre las actividades promotoras y los niveles de expresión de mRNA de *Fas* ( $r = 0.923$  con  $p < 0.001$  en el caso de la activación con PMA/Ionóforo, y  $r = 0.717$  con  $p = 0.003$  tras la activación con radiación  $\gamma$ ).



**FIGURA 10: Comparación entre la actividad promotora de *Fas* y su nivel basal de expresión transcripcional en las distintas cepas de ratón.**

La actividad promotora en células T Jurkat activadas se expresa como la razón [Actividad reportera normalizada de cada promotor / Actividad reportera normalizada del promotor de C57BL/6J]. Las células JK se trataron o bien con PMA/Ionóforo, o con Radiación gamma.

La actividad reportera normalizada se calcula como la razón [Valor de luciferasa / Valor de renilla]. El nivel de expresión transcripcional se normalizó utilizando un individuo C57BL/6J como calibrador.

## **6.- Análisis de los patrones de expresión transcripcional de *FasL*.**

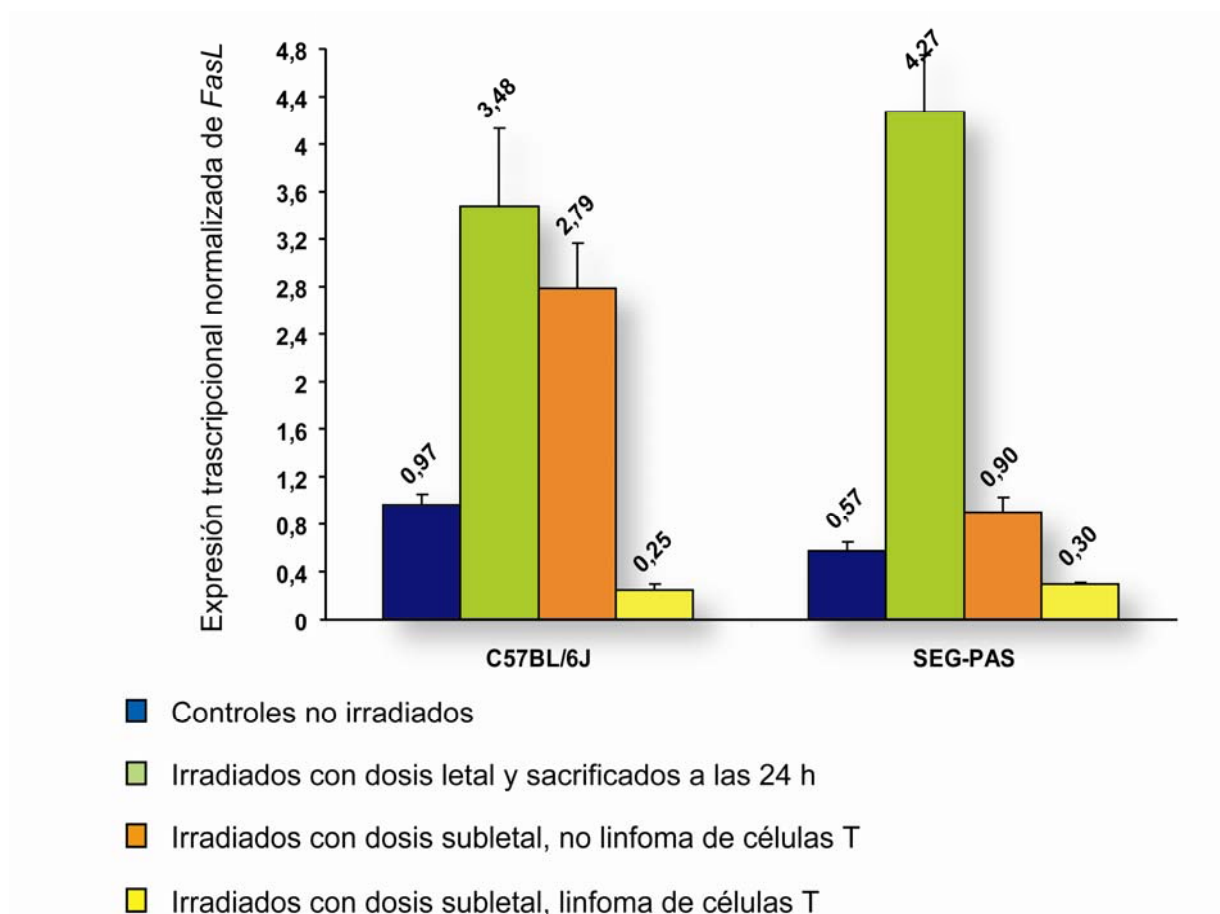
Una vez estudiada la funcionalidad de las variantes alélicas encontradas en el promotor del receptor *Fas*, y determinada su correlación con los distintos niveles de expresión transcripcional entre cepas con diferente grado de susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación  $\gamma$ , se planteó la necesidad de estudiar también los niveles de expresión de su ligando *FasL* para poder valorar la importancia del sistema *Fas/FasL* en la determinación de la susceptibilidad tumoral.

Los niveles de expresión transcripcional de *FasL* se determinaron igualmente mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, en timos de ratones pertenecientes a las dos cepas con diferencias más extremas en susceptibilidad, C57BL/6J y SEG/Pas (Figura 11). Como en el caso de *Fas*, los análisis se realizaron en ratones:

- No tratados.
- Tratados con dosis letal (1 dosis de 10 Gy) y sacrificados para su análisis tras 24 horas.
- Tratados con dosis subletal (4 dosis de 1.75 Gy) que no llegaron a desarrollar linfomas tímicos durante el período de latencia de 25 semanas.
- Tratados con cuatro dosis subletales que desarrollaron linfomas tímicos durante el período de latencia de 25 semanas.

La comparación entre los timos de individuos controles (no tratados) de las dos cepas reveló diferencias significativas entre los niveles de expresión transcripcional de *FasL*, siendo en este caso C57BL/6J la cepa con niveles basales más altos (media normalizada 0.9675, sd 0.08655), mientras que SEG/Pas exhibía niveles significativamente menores (media 0.5725, sd 0.0850).

En cuanto a los ratones tratados con dosis letal, la expresión de *FasL* sufrió un llamativo aumento en el timo con respecto al nivel basal en ambas cepas, pero en este caso la diferencia entre las cepas se invirtió. Así, SEG/Pas era ahora la cepa que mostraba los niveles más altos (media 4.2733, sd 0.4816), mientras que C57BL/6J exhibía los más bajos (media 3.4833, sd 0.6534).



**FIGURA 11:** Expresión transcripcional normalizada de *FasL* en timos de dos cepas de ratón (C57BL/6J y SEG/Pas) con diferencias extremas en la susceptibilidad genética al desarrollo de linfomas linfoblásticos de células T inducidos por radiación gamma.

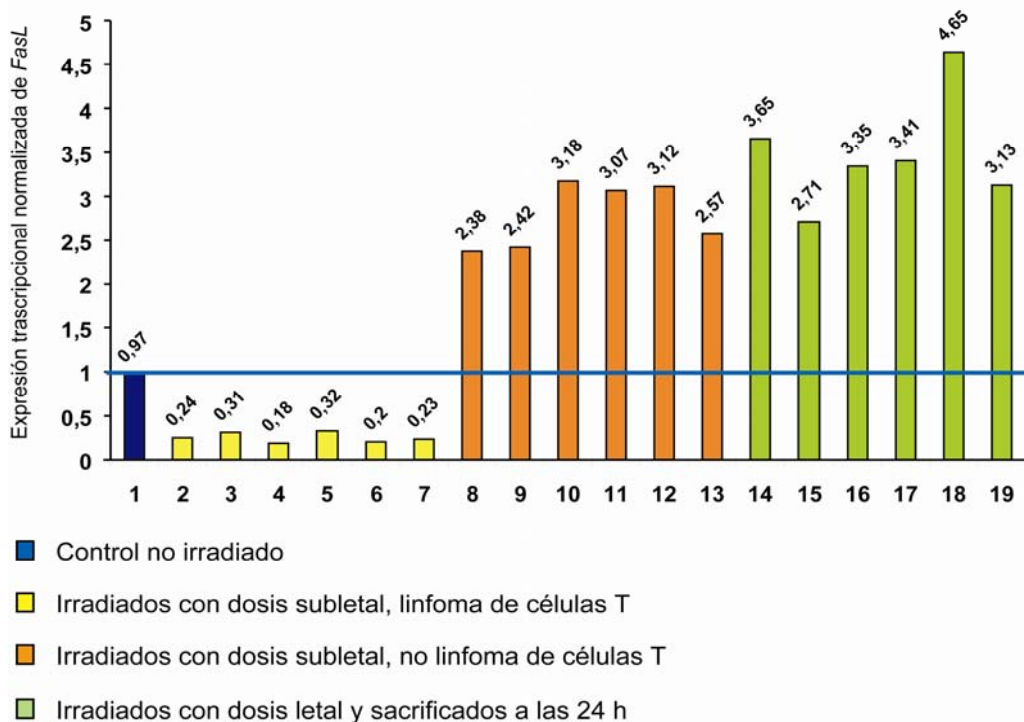
Las diferencias son significativas entre todos los grupos, excepto en el caso de los linfomas de células T, cuya expresión no es significativamente distinta entre las dos cepas.

En el caso de los individuos tratados con la dosis subletal, los que desarrollaron linfomas tímicos mostraron un descenso significativo en la expresión transcripcional de *FasL* con respecto al control, mientras que los que se resistieron al desarrollo de los linfomas mostraron un aumento en los niveles de expresión, tanto en C57BL/6J (media Linfoma tímico 0.2467, sd 0.0572; media no Linfoma tímico 2.7900, sd 0.3722), como en SEG/Pas (media Linfoma tímico 0.2967, sd 0.0234; media No Linfoma tímico 0.9033, sd 0.1305).

Las figuras 12 y 13 muestran por separado los resultados obtenidos en una muestra representativa de individuos de cada cepa.

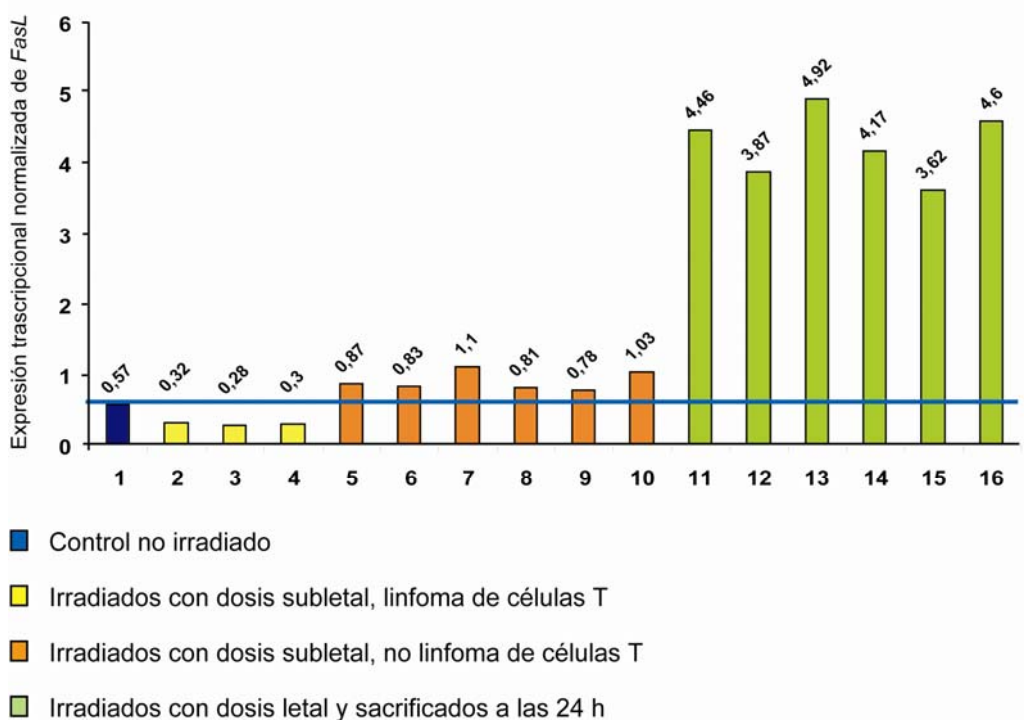
En la figura 12, se muestra el patrón de expresión en la cepa C57BL/6J: el carril 1 representa una muestra de timo control de un ratón no tratado, con un valor normalizado de expresión de 0.97; los carriles 2-8 representan muestras de ratones irradiados con dosis subletales que desarrollaron linfomas tímicos, con valores que oscilan entre 0.18 y 0.53; los carriles 9-17 corresponden a individuos tratados con dosis subletales que no llegaron a desarrollar tumor, con valores de expresión normalizada en el timo que varían entre 1.48 y 4.40; finalmente, los carriles 18-21 representan muestras de ratones irradiados con dosis letales y analizados a las 24 horas (los valores fluctúan entre 2.62 y 4.82).

La figura 13 muestra el patrón de expresión en la cepa SEG/Pas: el carril 1 es una muestra de timo control de un ratón no irradiado, con un valor de expresión normalizada de *FasL* de 0.57; los carriles 2-4 contienen muestras de ratones tratados con dosis subletales que desarrollaron linfoma tímico (los valores fluctúan entre 0.27 y 0.31); los carriles 5-11 contienen muestras de individuos irradiados con dosis subletales que no desarrollaron linfomas (valores entre 0.54 y 1.12); los carriles 12-14 corresponden a ratones tratados con dosis letales y analizados a las 24 horas (valores entre 3.75 y 4.76).



**FIGURA 12: Expresión transcripcional normalizada de *FasL* en timos de ratones C57BL/6J tratados con radiación gamma.**

Los datos son la media de dos experimentos independientes, cada uno por triplicado. Las diferencias son significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ).



**FIGURA 13: Expresión transcripcional normalizada de *FasL* en timos de ratones SEG/Pas tratados con radiación gamma.**

Los datos son la media de dos experimentos independientes, cada uno por triplicado. Las diferencias son significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ).



## **7.- Existen numerosos cambios de nucleótidos entre los promotores de *FasL* de las distintas cepas de ratón.**

Como ya se hiciera en el caso del receptor, para determinar si las diferencias de expresión encontradas entre las cepas se deben a cambios nucleotídicos significativos en la región promotora, el paso siguiente fue la amplificación y secuenciación de los promotores de *FasL* en las mismas dos cepas utilizadas para los análisis transcripcionales. Las secuencias fueron depositadas en el GenBank con sus correspondientes números de acceso (C57BL/6J: DQ846744; SEG/Pas: DQ846746), y se compararon con la secuencia previamente publicada de *Mus musculus* (Número de acceso en GenBank: AF045739) (Zhang et al., 2000). Como resultado de la comparación, se encontraron numerosos cambios de nucleótidos a lo largo de la secuencia promotora que diferenciaban ambas cepas (un total de 10 sustituciones, inserciones o deleciones) que permitieron la distinción de dos haplotipos claramente diferenciados. Considerando C57BL/6J como el haplotipo de referencia, el promotor de SEG/Pas tiene dos sustituciones nucleotídicas especialmente significativas por estar localizadas en sitios de unión de factores de transcripción clave: NF-E2 (–427 C/T, –430 A/G) y G6 (–578 T/C) (Figura 14).

		AP-3	GCR1
-689	C57BL/6J GCACCTCAGTTTTTCATCTGGTGACCAGAAGAGAGATTGCAAAGTTAAATGATTACAGAGGAGGAAGGCTACATTTCCCAG		
	SEG/Pas	.....T.....	.....
		G6-FACTOR*	
-609	C57BL/6J GGGAAGTGGGATGGATAGGGGGCAGGCACAGTGGGGGGTTAGGGCAGCCTTGAACACCTGGCACACATTCTGGTTGCAG		
	SEG/Pas	.....C.....	.....A.....
		GR	
-529	C57BL/6J CTGGCTGATGTTTCAGGGAAGGGACTTCAACAGAGGATTCAACTCCCTATGCTCAGATGTGGAGATATCTTCTCTAGCCGA		
	SEG/Pas	.....C.....	.....
		FasL-κB2	NF-E2*
-449	C57BL/6J ACTCCTTGGTCTTTTCCCATGCCTCAGCACCAACAGGCCTCTCAGGACACACCCAGAGCTGCGGAAGAGCTAATGTCC		
	SEG/Pas	.....AG..T.....	.....
		CD28-RE	NF-AT
-369	C57BL/6J TCAAGGGGTATCCAGCGCTGACTTGCTGAGTTGGACCTCAGGCAGGCAAGCCTGGTTTACCAGCCTTCTCAGTTAGCACA		
	SEG/Pas	.....	.....
		SP1	NF-AT NFκB
-289	C57BL/6J GAGACGCCAATTGGAACCTCGAAGACTTGTCGTCAGAAATTTCTGGGC	GGAAACTTCCTGGGGTTGCTGTGAGCTTTTGG	
	SEG/Pas	.....	.....
		NFκB	RAP-1 NF-AT
-209	C57BL/6J AGGCTTCTCAGCTTCAGATGCAAGTGAGTGGGTGTCTCACAGAGAAGCAAAGAGAAGAGAACAGGAGAAAGGTGTTTCCC		FasL-κB1
	SEG/Pas	.....G.....	.....
		TATA BOX	
-129	C57BL/6J TTGACTGCGGAACTTTATAAAGAACTTAGCTTCTCTGGAGCAGTCAGCGTCAGAGTTCTGTCCTTGACACCTGAGTC		
	SEG/Pas	.....T.....	.....T.....
-49	C57BL/6J TCCTCCACAAGGCTGTGAGAAGGAAACCCTTTCCTGGGGCTGGGTGCCATG		
	SEG/Pas	..---.....	.....

**FIGURA 14: Comparación entre las secuencias promotoras de *FasL* de ratones de las cepas C57BL/6J y SEG/Pas.**

Los números a la izquierda indican la posición del nucleótido desde el sitio de inicio de la transcripción. Los puntos indican identidad en la secuencia, y los polimorfismos se indican con la correspondiente sustitución o delección de nucleótido. Los sitios de unión de factores de transcripción están subrayados (o bien, sombreados, recuadrados o en cursiva cuando se solapan), en base a sitios potenciales o demostrados descritos previamente (Crist et al., 2003; Latinis et al., 1997; Matsui et al., 1998; Matsui et al., 2000; McClure et al., 1999; Zhang et al., 2000). Los polimorfismos situados en sitios de unión de factores de transcripción están marcados con un asterisco.

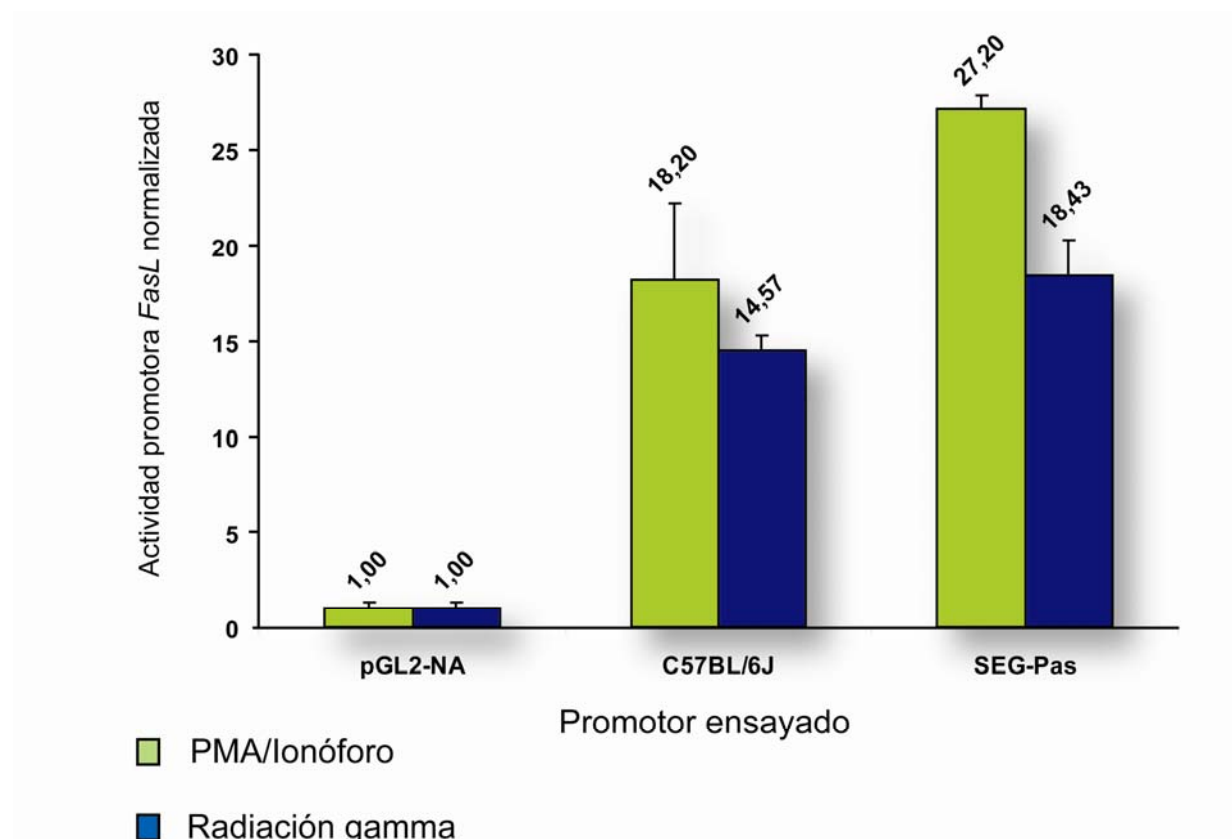
## **8.- Los cambios nucleotídicos encontrados en el promotor de *FasL* constituyen polimorfismos funcionales.**

Una vez demostrada la existencia de cambios nucleotídicos en la secuencia promotora de *FasL*, se investigó la posible funcionalidad de las dos variantes haplotípicas mediante ensayos de luciferasa en células Jurkat activadas con PMA/Ionóforo o con radiación- $\gamma$ . Como ya se hiciera con los ensayos del promotor de *Fas*, se eligió una dosis de 10 Gy como inductora eficaz de apoptosis.

Los resultados demuestran claramente que en el caso del tratamiento con PMA/Ionóforo el promotor de *FasL* de C57BL/6J era capaz de dirigir la transcripción del gen de la luciferasa hasta un aumento de 18.20 veces con respecto al vector vacío en células no activadas (pGL2-NA). Cuando la activación se realizó con radiación- $\gamma$ , el aumento fue de 14.57 veces (Figura 15). Cuando se utilizó el promotor de SEG/Pas los incrementos fueron de 27.20 veces (PMA/Ionóforo) y 18.43 veces (radiación  $\gamma$ ), siempre con respecto al vector vacío.

La validez de estos resultados se sustenta de nuevo en el hecho de que, en todos los casos, la actividad promotora superó en al menos dos veces a la del plásmido vacío (Hoogendoorn et al., 2003).

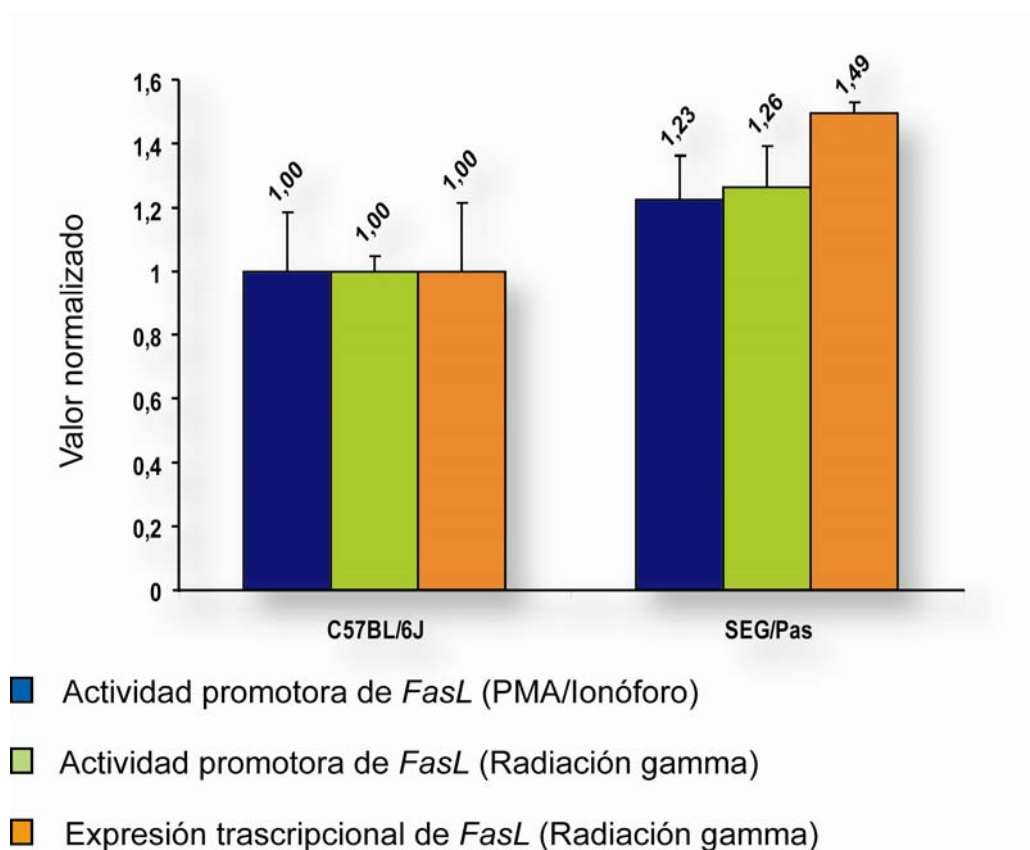
Para facilitar las comparaciones, la actividad normalizada de cada promotor se refirió a la de C57BL/6J (Figura 16). Y al hacerlo de esta manera se pudo comprobar que existe una correlación significativa entre la actividad promotora de *FasL* en cada cepa y los niveles de expresión transcripcional de dicho gen mediante RT-PCR cuantitativa, tras someter a los ratones a una dosis letal de 10 Gy ( $r=0.9107$  en el caso de células Jurkat activadas con PMA/Ionóforo, y  $r=0.9247$  en el caso de activación con radiación  $\gamma$ ).



**FIGURA 15: Actividad promotora de *FasL* en células T Jurkat activadas.**

El incremento de actividad (*fold increase*) se calcula como la razón [Actividad reportera normalizada de cada promotor en células activadas / Actividad reportera normalizada del pGL2 vacío en células no activadas] (pGL2-NA). La actividad reportera normalizada se calcula como la razón [Valor de luciferasa / Valor de renilla]. Las células JK se trataron bien con PMA/Ionóforo o con Radiación gamma.

Los datos son la media de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Todas las diferencias son significativas (PMA/Ionóforo:  $p=0,01$  y  $\gamma$ -Irradiación:  $p=0,004$ ).



**FIGURA 16: Comparación entre la actividad promotora de *FasL* y su nivel de expresión transcripcional en las distintas cepas de ratón.**

La actividad promotora en células T Jurkat activadas se expresa como la razón [Actividad reportera normalizada de cada promotor / Actividad reportera normalizada del promotor de C57BL/6J]. La actividad reportera normalizada se calcula como la razón [Valor de luciferasa / Valor de renilla]. Las células JK se trataron o bien con PMA/Ionóforo, o con Radiación gamma.

El nivel de expresión transcripcional se normalizó utilizando un individuo C57BL/6J como calibrador, y corresponde al timo de ratones irradiados con dosis letal (10 Gy) y sacrificados a las 24 h.

## **9.- También hay numerosos cambios de nucleótidos en las secuencias codificantes de *Fas* y de *FasL*.**

Una vez analizada la influencia de los promotores de *Fas* y de *FasL* en los niveles de expresión transcripcional de las distintas cepas de ratón, se procedió al análisis de las secuencias codificantes de ambos genes, en busca de otros cambios capaces de influir en la actividad biológica de ambas proteínas.

Para ello, se amplificaron y secuenciaron los cDNAs de *Fas* y *FasL* de las cepas C57BL/6J y SEG/Pas (Números de acceso en Genbank: C57BL/6J *Fas*: DQ846748; SEG/Pas *Fas*: DQ846749; SEG/Pas *FasL*: DQ846747), y se compararon con las secuencias previamente publicadas de *Mus musculus* en el caso de *Fas* (Número de acceso en Genbank: NM\_007987), y de C57BL/6J en el caso de *FasL* (Número de acceso en Genbank: NM\_010177).

El análisis comparativo demostró la existencia de un número considerable de variaciones en las secuencias nucleotídicas de las dos cepas, que permitieron distinguir dos haplotipos perfectamente diferenciados.

Si se considera C57BL/6J como la cepa de referencia, la secuencia codificante de *Fas* en la cepa SEG/Pas presenta un total de 24 cambios nucleotídicos. De ellos, sólo una minoría (siete sustituciones) no afecta a la secuencia de aminoácidos y se podrían considerar cambios sinónimos o silenciosos sin implicaciones funcionales (polimorfismos). Sin embargo, la mayoría de los cambios encontrados suponen cambios aminoacídicos y podrían representar variaciones o polimorfismos funcionales que se heredarían a través de la línea germinal.

En la cepa SEG/Pas, la región del cDNA de *Fas* que codifica la porción extracelular de la proteína tiene doce sustituciones en la secuencia nucleotídica que suponen un cambio de aminoácido (Figura 17) (P58L, Q60S, K63E, M71T, T75K, T77I, A79T, P80S, N91K, L117P, P134S, A143T), y la porción intracelular tiene cinco (R209H, M255I, S258N, K312N, T317I).

		Signal Peptide	Extracellular Region		CRD1
C57BL/6J	1	MLWIAVLPVLVLAGSQLRVHT	QGTNSISESLKLR	RRVRETDKNCSEGLYQGGPFCCQPCQ	
SEG/Pas	1	.....	.....	.....	.....L.S
		CRD1	CRD2		
C57BL/6J	61	PGKKKVEDCKMNGGTPTCAPCTEGKEYMDKNHYADK	CRRCTLCDEEHGLE	VETNCTLTQN	
SEG/Pas	61	..E.....T...K.I.	TS.....K.....	.....P...	
		CRD3	Transmembrane		
C57BL/6J	121	TKCKCKPDFYCDSPGCEHC	VRCASCEHGTLEPCTATSNTNCRKQSPRNRL	WLLTILVLLI	
SEG/Pas	121	.....S.....T.....	.....	.....	
		Region	Intracellular Region	Death Domain	$\alpha 2$ Subdomain
C57BL/6J	181	PLVFIYRKYRKRKCWKRRQDDPESRTSSRETIPMNASNLSLSKYIPRIAEDMTI	QEAKKF		
SEG/Pas	181	.....H.....	.....	.....	
		$\alpha 3$ Subdomain			
C57BL/6J	241	ARENN	IKEGKIDEIMHDSIQD	TAEQKVQLLLCWYQSHGKSDAYQDLIKGLKKAECRRTLD	
SEG/Pas	241	.....I..N.....	.....	.....	
C57BL/6J	301	KFQDMVQKDLGKSTPDTGNENEGQCLE			
SEG/Pas	301	.....N....I.....			

**FIGURA 17: Comparación entre las secuencias de aminoácidos de Fas en ratones C57BL/6J y SEG/Pas.**

Los números a la izquierda indican la posición del aminoácido desde el codón de iniciación. Los puntos indican identidad en la secuencia, y los polimorfismos se indican con la correspondiente sustitución de aminoácido. El péptido señal de Fas y la región transmembrana aparecen sombreados para discriminar la región extracelular de la intracelular, ambas en blanco. La región extracelular consta de los tres dominios ricos en cisteína (CRD1, 2 y 3). CRD1 y CRD3 aparecen subrayados para distinguirlos del CRD2. La región intracelular contiene el Dominio de Muerte (subrayado), que a su vez consta de varios subdominios, entre ellos el  $\alpha 2$  (recuadro) y el  $\alpha 3$  (recuadro y cursiva).

En el caso de FasL (Figura 18), se encontraron un total de doce sustituciones nucleotídicas, dos de ellas implicadas en un cambio en la secuencia de aminoácidos en la región que codifica la porción intracelular de la proteína (A24T, C35S), y cuatro en la región extracelular (P141L, G178S, T184A, E218G).

Intracellular Region		
C57BL/6J	1	MQQPMNYPCPQIFWVDSSATSSWAPPGSVFPCPSCGPRGPDQRRPPPPPPPVSPLPSPSQ
SEG/Pas	1	.....T.....S.....
Transmembrane Region		
C57BL/6J	61	PLPLPPLTPLKKKDHNTNLWLPVVFVMVLVALVGMGLGMYQLFHLQKELAEFREFTNQSL
SEG/Pas	61	.....
Extracellular Region		
C57BL/6J	121	KVSSFEEKQIANPSTPSEKKEPRSVAHLTGNPHSRSIPLWEDTYGTALISGVKYYKKGGLV
SEG/Pas	121	.....L.....S..
Extracellular Region		
C57BL/6J	181	INETGLYFVYSKVYFRGQSCNNQPLNHKVYMRNSKYPEDLVLMEEKRLNYCTTGQIWAHS
SEG/Pas	181	...A.....G.....
Extracellular Region		
C57BL/6J	241	SYLGAVFNLTSAHLYVNISQLSLINFEEKSTFFGLYKL
SEG/Pas	241	.....

**FIGURA 18: Comparación entre las secuencias de aminoácidos de FasL en ratones C57BL/6J y SEG/Pas.**

Los números a la izquierda indican la posición del aminoácido desde el codón de iniciación. Los puntos indican identidad en la secuencia, y los polimorfismos se indican con la correspondiente sustitución de aminoácido. La región transmembrana aparecen sombreada para discriminar la región intracelular de la extracelular, ambas en blanco.



## **10.- Los cambios nucleotídicos encontrados en los cDNAs de Fas y FasL son polimorfismos funcionales que afectan a la actividad biológica del sistema.**

Para determinar si los cambios nucleotídicos encontrados son polimorfismos funcionales capaces de afectar a la capacidad del sistema Fas/FasL para inducir apoptosis, se diseñaron una serie de experimentos *in vitro* basados en la transfección de células humanas HEK-293T con el cDNA del receptor o del ligando, y la confrontación de células transfectadas en todas las combinaciones posibles ligando-receptor (homólogas y heterólogas) de las dos cepas de ratón (C57BL/6J y SEG/Pas). La funcionalidad de las distintas combinaciones se determinó midiendo la actividad caspasa-8, que se activa específicamente en la vía extrínseca de apoptosis, en respuesta al sistema Fas/FasL (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Barnhart et al., 2003; Scaffidi et al., 1998). La elección de esta línea celular humana se debió a tres razones fundamentales: (i) su facilidad para ser transfectadas, (ii) por carecer de expresión endógena de Fas y (iii) por los bajos niveles de expresión de FasL en relación con la expresión exógena después de la transfección.

Las células HEK-293T que expresaban transitoriamente las variantes C57BL/6J o SEG/Pas de Fas o de FasL, se combinaron para estudiar el funcionamiento de los sistemas receptor-ligando homólogos (C57BL/6J Fas - C57BL/6J FasL y SEG/Pas Fas - SEG/Pas FasL) y los heterólogos (C57BL/6J Fas - SEG/Pas FasL y SEG/Pas Fas - C57BL/6J FasL).

La cantidad de caspasa-8 activa se determinó mediante un ensayo que ligaba su activación a la actividad luciferasa de una construcción genética en un “kit” comercial (Caspase-Glo 8 Assay, Promega). Para establecer el tiempo óptimo de incubación entre las células diana (que expresan receptor) y las células efectoras (que expresan ligando), se definió una curva de tiempo midiendo la actividad caspasa-8 a las 6, 8 y 24 horas. El experimento permitió elaborar una curva en la que la activación y la fiabilidad máximas del ensayo aparecían a las 8 horas. Por tanto, la actividad caspasa-8 se determinó siempre a las 8 horas de combinar las células de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ensayo consiste, básicamente, en la detección de la proteólisis por caspasa-8 activa de un sustrato específico, que a su vez libera aminoluciferina (un sustrato para la

luciferasa). El resultado es la producción de una señal lumínica proporcional a la cantidad de caspasa-8 activa presente.

El tiempo óptimo de incubación con el reactivo Caspase-Glo 8 Reagent (30 minutos) se determinó después de una serie de ensayos y la elaboración de una curva entre 30 minutos y 3 horas.

Los resultados evidenciaron diferencias sustanciales en la funcionalidad del sistema Fas/FasL dependiendo de las variantes alélicas utilizadas (Figura 19). Así, el sistema homólogo derivado de SEG/Pas era el que proporcionaba una mayor cantidad de caspasa-8 activa, superando en más de un 100% más a la actividad del sistema homólogo derivado de C57BL/6J, que es el que menor caspasa-8 activa genera. Si se considera el sistema homólogo de C57BL/6J como referencia (y por tanto un valor de caspasa-8 activa normalizado a 1), el sistema homólogo de SEG/Pas alcanzaba un valor de 2.12. Mientras tanto, las combinaciones heterólogas daban valores intermedios entre 1.55 (C57BL/6J Fas- SEG/Pas FasL) y 1.65 (SEG/Pas Fas-C57BL/6J FasL).

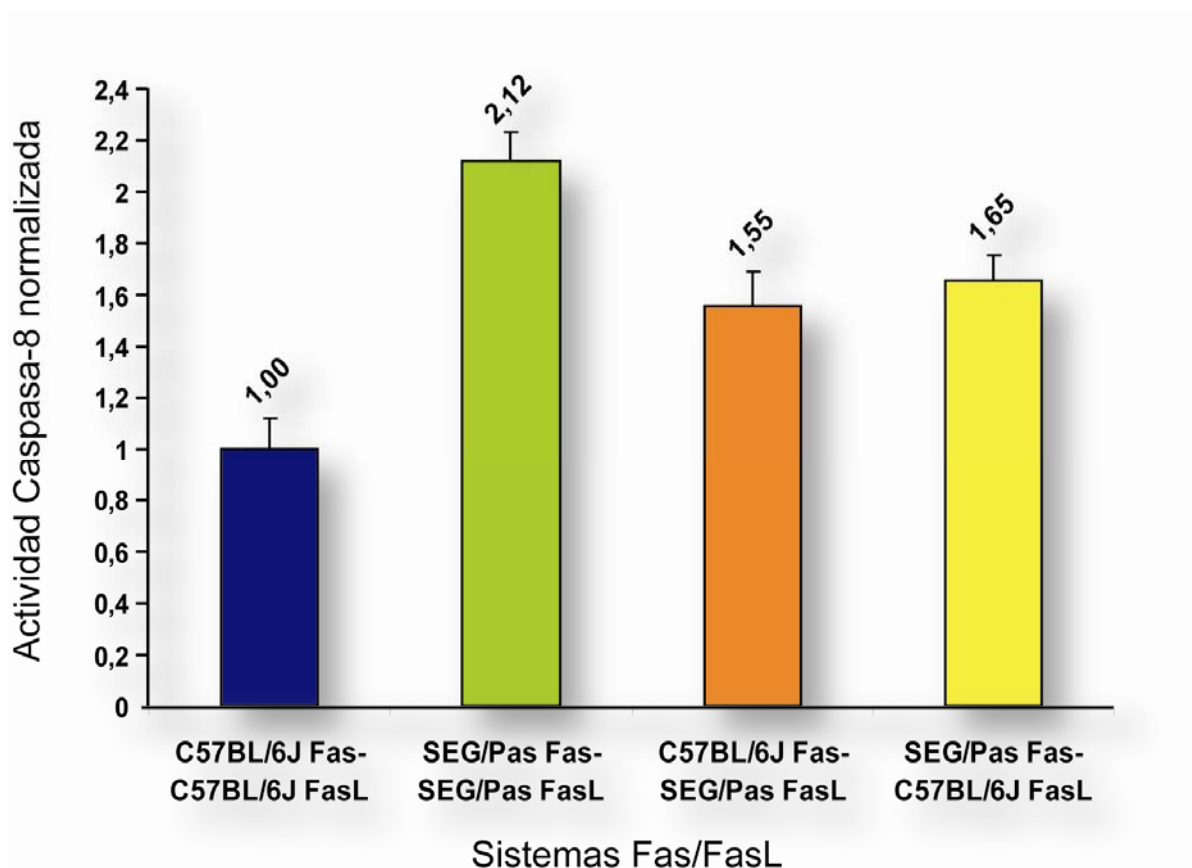
### ***11.- El carácter funcional de los polimorfismos se confirmó mediante Western-blotting, con anticuerpos que discriminan las formas activas e inactivas de las caspasas.***

Para confirmar los resultados anteriores, se decidió medir la activación de caspasa-8 mediante *Western-blotting*. La activación de la caspasa-8 se produce mediante el corte de la procaspasa (57 kDa) para dar lugar a una forma intermedia de 43 kDa, que finalmente se convierte en la forma activa de 18 kDa. Al analizarse los extractos proteicos derivados de las combinaciones de células mencionadas anteriormente, se pudo corroborar que el sistema homólogo de SEG/Pas presenta la máxima cantidad de caspasa-8 proteolizada (cantidades relativas en torno a 1.97 utilizando el sistema homólogo derivado de C57BL/6J como valor 1 de referencia), mientras que el sistema homólogo derivado de C57BL/6J genera el nivel más bajo de caspasa-8 activada, y los sistemas heterólogos vuelven a dar valores intermedios (entre 1.56 y 1.80) (Figura 20). En esta figura se muestra la banda correspondiente a la forma intermedia, de 43 kDa, pero no la banda de 18 kDa, por su interferencia con otras bandas inespecíficas. Es decir, los resultados de los *Westerns* concuerdan con los obtenidos anteriormente con el ensayo Caspase-Glo 8 Assay (Promega) y confirman que

los polimorfismos en las secuencias codificantes de Fas y FasL afectan a la actividad biológica del sistema Fas/FasL.

La apoptosis mediada por receptores de muerte como Fas (vía extrínseca), no termina en la activación de la caspasa-8, sino que ésta acaba activando a la caspasa-3, que tiene ya una función efectora al final de la vía apoptótica y constituye un elemento de confluencia entre las vías extrínseca e intrínseca. Por tanto, para confirmar los resultados anteriores y para comprobar si las alteraciones en la activación de caspasa-8 entre cepas se traducen en un aumento global de los niveles apoptóticos, se analizó también la activación de caspasa-3 mediante *Western blotting*.

Como es bien sabido, la procaspasa-3 de 32 kDa, se proteoliza para generar una forma intermediaria de 20 kDa y una subunidad activa de 11 kDa (p11). Posteriormente, la proteína intermediaria de 20 kDa se corta y genera la subunidad activa p17. La forma activa de la enzima caspasa-3 es un heterodímero que consta de dos subunidades p11 y dos subunidades p17. Al analizar nuestros datos se pudo comprobar que el sistema homólogo SEG/Pas generaba la cantidad más alta de subunidad activa p17 (en torno a 1.97 tomando como referencia el sistema homólogo C57BL/6J), y los sistemas heterólogos conseguían, de nuevo, valores intermedios de activación de caspasa-3 (entre 1.51 y 1.79) (Figura 20). Estos resultados parecen indicar que el efecto que las variantes alélicas de Fas y FasL provocan en la activación de caspasa-8 se traduce en un efecto apoptótico global, y por tanto los polimorfismos en las secuencias codificantes de Fas y FasL afectan a la actividad biológica del sistema Fas/FasL.

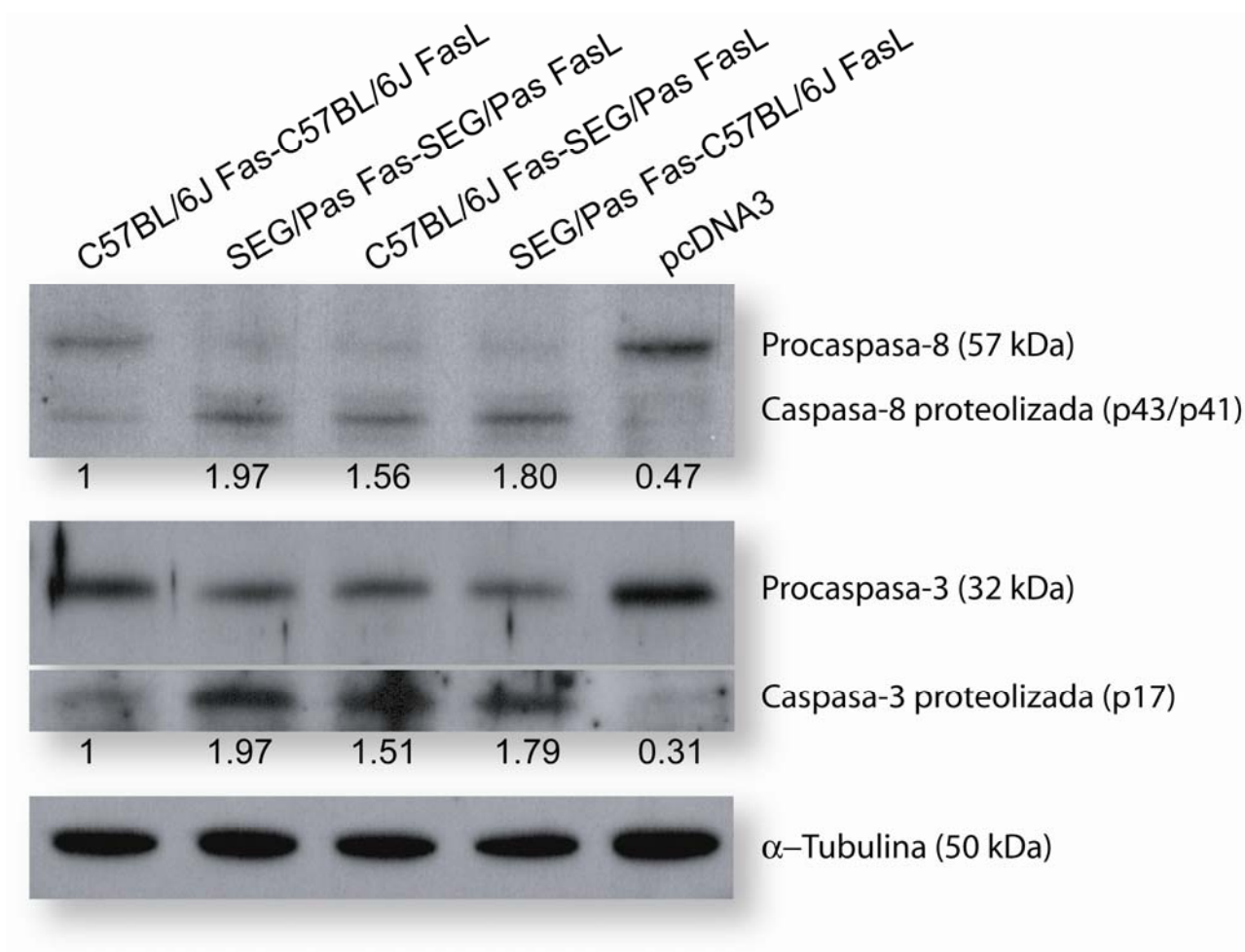


**FIGURA 19: Actividad caspasa-8 inducida por el sistema Fas/FasL, en combinaciones homólogas y heterólogas a partir de las cepas C57BL/6J y SEG/Pas.**

El ensayo Caspase-Glo 8 Assay (Promega) mide la cantidad de caspasa-8 activa mediante un procedimiento ligado a la actividad luciferasa. La actividad caspasa-8 normalizada en cada sistema se expresa como la razón [Valor medio de RLU de cada sistema - blanco / Valor medio de RLU de (C57BL/6J Fas-C57BL/6J FasL) - blanco]

(Blanco, sin células; RLU, Unidades Relativas de Luminiscencia).

Los datos son la media de tres experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado. Las diferencias son significativas entre todos los grupos ( $P < 0.01$ ), excepto entre las combinaciones heterólogas.



**FIGURA 20: Activación de las caspasas-8 y 3, inducida por el sistema Fas/FasL.**

Mediante Western Blot, detectamos la proteólisis (y por tanto la activación) de las procaspasas-8 y 3, en extractos proteicos obtenidos a partir de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con las distintas combinaciones de Fas y FasL de las cepas C57BL/6J y SEG/Pas.

Debajo de cada figura, se muestra el valor normalizado de caspasa proteolizada, obtenido tras densitometrar las bandas, normalizarlas con respecto a la  $\alpha$ -Tubulina, y obtener la razón entre el valor de (C57BL/6J Fas-C57BL/6J FasL).

## *Discusión*

## **1.- El sistema Fas/FasL podría constituir una barrera defensiva frente al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación gamma.**

En anteriores publicaciones nuestro grupo había demostrado la existencia en el cromosoma 19 de un locus de resistencia a la inducción de linfomas tímicos con radiación  $\gamma$  (*Tl1r1*, del inglés *Thymic lymphoma resistance locus-1*) en una región que contiene el locus del gen *Fas* como posible gen-candidato-modificador, y había detectado que la expresión de este gen era apenas perceptible en linfomas linfoblásticos de células T inducidos con radiación en la cepa sensible C57BL/6J (Santos et al., 2001; Santos et al., 2002). Por tanto, para confirmar si *Fas* está realmente implicado en la susceptibilidad al desarrollo de este tipo de tumores, que en su inmensa mayoría son linfomas linfoblásticos de células T (datos no mostrados), se analizaron sus patrones de expresión transcripcional *in vivo* mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, en timos de ratones no tratados y tratados con una sola dosis letal de radiación o con cuatro dosis subletales (Figura 6). Además, y dado que *Fas* es un receptor que actúa necesariamente en conjunción con su ligando *FasL*, se analizó también la posible implicación de *FasL* en dicha susceptibilidad. Finalmente, para valorar el posible efecto modulador o modificador del sistema, se utilizaron cepas consanguíneas de ratones con diferencias significativas en su grado de susceptibilidad genética al desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T inducidos con radiación  $\gamma$  (Figura 7-Fas, Figura 11-FasL).

El primer resultado significativo fue la constatación de que ambos genes (*Fas* y *FasL*) experimentaban una clara sobre-expresión *in vivo* en los timos de ratones 24 horas después de haber sido sometidos a un tratamiento con 10 Gy. La sobre-expresión ocurría en todas las cepas utilizadas, aunque se detectaron valores significativamente diferentes entre ellas. La acción concomitante del receptor y el ligando podría constituir, por tanto, una primera barrera defensiva para paliar los daños de la radiación y evitar así la transformación celular. Es decir, el sistema Fas/FasL podría ser crítico en la eliminación de las células dañadas dentro del timo. El aumento en los niveles de expresión de *Fas* en los timocitos inmaduros, se vendría a sumar al que otros autores habían descrito en células T del bazo de ratones tratados, y en suspensiones de células T periféricas irradiadas en tubos de ensayo (Booker et al., 1998; Pinkoski and Green, 1999; Reap et al., 1997; Siegel et al., 2000a).

Otro hecho significativo fue la observación de que el aumento significativo en los niveles de expresión tanto de *Fas* como de *FasL* se mantenía en los ratones que no habían desarrollado linfomas después de un largo período de latencia tras su tratamiento con cuatro dosis subletales de radiación. Este aumento podría ser beneficioso para evitar el desarrollo del tumor, y extendería la importancia de la barrera *Fas/FasL* para mantener el fenotipo de resistencia tumoral mucho más allá de los efectos inmediatos de la irradiación.

Finalmente, merece la pena destacar que los niveles de expresión de *Fas* y *FasL* son extremadamente bajos en los linfomas linfoblásticos de células T inducidos por radiación gamma, con independencia de la cepa de ratón y de su grado de susceptibilidad. Estos hechos confirman los datos previos obtenidos por nuestro grupo con el gen *Fas*, y los hacen ahora extensivos al gen *FasL*, confirmando el papel antitumoral del sistema *Fas/FasL*. Más aún, dado que los linfomas de todas las cepas presentan niveles similares de expresión de *Fas* y de *FasL*, sugerimos la existencia de umbrales mínimos en la expresión de *Fas* y de *FasL*, por debajo de los cuales cualquier timo podría desarrollar un linfoma. Esta hipótesis serviría de base para explicar el hecho de que los linfomas tímicos sean más frecuentes en las cepas que presentan niveles inducidos de expresión más bajos (como es el caso de las cepas susceptibles), y menos frecuentes en las cepas que exhiben niveles más altos (como es el caso de las cepas resistentes SPRET/Ei y SEG/Pas). Todos estos datos, en su conjunto, reforzarían el papel de *Fas* y *FasL* como genes supresores del linfoma de células T.

El aumento concomitante de la expresión de *Fas* y *FasL* en los timos de ratón tras el tratamiento con radiación  $\gamma$ , y la disminución también simultánea de la expresión de ambos genes en los linfomas, podría explicarse a nivel molecular por el hecho de que ambos genes tienen elementos reguladores críticos comunes en sus regiones promotoras (NF- $\kappa$ B y NF-AT). Sin embargo, este comportamiento paralelo resulta contrario a lo que se ha publicado en otro tipo de tumores. Varios autores han descrito que los tumores sólidos expresan niveles elevados de *FasL* y reducidos de *Fas* (Botti et al., 2004; Soubrane et al., 2000), porque la sobre-expresión de *FasL* podría proporcionar una cierta ventaja a las células tumorales, al activar vías independientes de la apoptosis que resultan en la sobre-expresión de genes antiapoptóticos y tumorigénicos, y/o en un aumento de la motilidad y la invasividad, sobre todo en células resistentes a la apoptosis



(Barnhart et al., 2004). Por el contrario, nuestros resultados indican que en la linfomagénesis linfoblástica de células T no se precisa el aumento de *FasL* para proliferar, sino la disminución simultánea o concomitante en la expresión tanto de *Fas* como de *FasL* para evitar la apoptosis.

La disfunción del sistema Fas/FasL por la aparición de mutaciones puntuales en alguno de estos genes, parece ir ligada al desarrollo de enfermedades autoinmunes, SIDA, y algunos tipos de cánceres (Baumann et al., 2002; Krammer, 2000; Li-Weber and Krammer, 2003; Peter et al., 1997; Peter et al., 2005). En concreto, se ha descrito que las mutaciones en heterocigosis en la línea germinal del gen *Fas* causan el síndrome linfoproliferativo autoinmune, junto con defectos en la apoptosis y un elevado riesgo de desarrollar linfomas, básicamente de tipo B (Legembre et al., 2004; Peter et al., 1997). En estos casos se ha propuesto que la inducción de apoptosis por el sistema Fas/FasL requiere que los dos alelos del gen *Fas* sean normales (salvajes), mientras que las células que expresan un alelo salvaje y otro mutado podrían activar una vía proliferativa que implica al factor NF- $\kappa$ B (Legembre et al., 2004). Sin embargo, nadie ha demostrado si la predisposición al cáncer requiere la presencia de al menos un alelo mutado, o si bastaría con unos niveles de expresión suficientemente bajos de los alelos salvajes. Nuestros resultados sugieren que unos niveles de expresión suficientemente reducidos (por debajo de un cierto umbral) de los alelos salvajes de ambos genes, *Fas* y *FasL*, podrían influir en la susceptibilidad tumoral, al favorecerse (posiblemente) vías proliferativas en detrimento de las apoptóticas.

## **2.- Las variaciones en los niveles de expresión de *Fas* y *FasL* podrían explicar las diferencias en susceptibilidad de las diferentes cepas de ratón.**

Para evaluar si *Fas* juega realmente un papel como modulador de la resistencia/susceptibilidad, se estudiaron sus patrones de expresión en una serie de cepas con diferencias en su grado de susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación gamma (Figura 7). Si la disminución de los niveles de *Fas* estuviera contribuyendo al desarrollo de los linfomas, seria razonable pensar que las

diferencias en los niveles de expresión corriesen paralelas al grado de susceptibilidad de las dos cepas. Curiosamente los niveles más altos de expresión se encontraron en las cepas más resistentes (SPRET/Ei y SEG/Pas), mientras que los niveles más bajos se daban en las cepas más sensibles (C57BL/6J y RF/J). Además, la cepa BALB/cJ, con un grado intermedio de susceptibilidad, mostraba también niveles intermedios de actividad transcripcional de *Fas*.

Para determinar si *FasL* actúa también como modulador en conjunción con su receptor, se determinaron igualmente sus patrones de expresión en ratones de las dos cepas con diferencias más acusadas de susceptibilidad (C57BL/6J y SEG/Pas) (Figura 11). Aunque la cepa más sensible (C57BL/6J) tiene unos niveles más altos de expresión, esta diferencia se invierte 24 horas después del tratamiento de las cepas con una única dosis de radiación  $\gamma$ , de tal modo que los niveles de expresión de la cepa resistente llegan a superar los niveles de los timos controles en torno a 7.5 veces, mientras que los de la cepa sensible lo hacen tan solo en torno a 3.6 veces. Por tanto, se podría asumir que los linfomas linfoblásticos de células T son más frecuentes en C57BL/6J, porque esta cepa demuestra una menor capacidad de respuesta apoptótica mediada por *Fas/FasL* en defensa a la radiación. Además, la contribución compartida o simultánea tanto del receptor como del ligando creando una barrera antitumoral se refuerza como una idea novedosa y atractiva.

### **3.- La respuesta diferencial de *Fas* y *FasL* se podría explicar por la existencia de polimorfismos funcionales en sus regiones promotoras.**

Dado que se han descrito algunos polimorfismos en el promotor de *Fas* y en el de *FasL* que podrían estar relacionados con el riesgo de desarrollar algunos síndromes que incluyen procesos neoplásicos (Feuk et al., 2003; Lai et al., 2003; Sibley et al., 2003; Sun et al., 2004; Sun et al., 2005; Wu et al., 2003; Zhang et al., 2005), se decidió analizar comparativamente las secuencias promotoras de estos dos genes en las cepas de ratón mencionadas, y estudiar la posible funcionalidad de las variantes encontradas mediante ensayos de luciferasa.

Como era de esperar, en ambos casos se identificaron numerosos cambios de nucleótidos (polimorfismos) a lo largo de las dos regiones promotoras, llamando especialmente la atención los que afectaban a sitios específicos de unión de factores de transcripción. En el caso de *Fas* las cinco cepas podían clasificarse en tres “haplotipos funcionales” en base a la secuencia nucleotídica y la funcionalidad de sus promotores (Figura 9). En concordancia con nuestra hipótesis, el promotor de las cepas más resistentes (SPRET/Ei y SEG/Pas) era capaz de dirigir la máxima producción posible de luciferasa, el de las cepas más sensibles (C57BL/6J y RF/J) producía los niveles más bajos de expresión, y el de las cepas con sensibilidad intermedia (BALB/cJ) niveles intermedios de luciferasa.

Dado que el promotor de BALB/cJ difiere del de C57BL/6J en una sustitución nucleotídica que afecta a un sitio de unión del factor de transcripción AP1, esta variación podría ser responsable de los niveles intermedios de actividad promotora que se observaron en esta cepa. El cambio mencionado en el sitio de unión AP1 podría alterar la afinidad de factores de transcripción como Jun y/o Fos por el DNA de la región promotora. En este sentido resulta interesante recordar que *c-fos* se sobre-expresa durante la selección negativa en los timocitos (DeRyckere et al., 2003; Schmitz et al., 2003), y que la vía de la c-Jun N-terminal kinasa (JNK) también parece jugar un papel importante en dicha selección (DeRyckere et al., 2003).

Por otro lado, la secuencia nucleotídica del promotor del grupo *Mus spretus* (SPRET/Ei y SEG/Pas), que dirige los niveles más altos de actividad luciferasa, difiere de la del promotor de C57BL/6J y RF/J en dos cambios que afectan a los sitios de unión de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y NF-AT. Se sabe que ambos son importantes en la regulación transcripcional del gen *Fas*, tanto en el ser humano como en el ratón, y están implicados en la generación y supervivencia de los timocitos, así como en la apoptosis intra-tímica (Chan et al., 1999; Hettmann et al., 1999; Hettmann and Leiden, 2000; Oukka et al., 1998; Zheng et al., 2001).

En el caso de *FasL*, los análisis se realizaron únicamente en las dos cepas con diferencias más acusadas de susceptibilidad (SEG/Pas y C57BL/6J), y el análisis comparativo de la secuencia nucleotídica de sus promotores permitió distinguir dos haplotipos claramente diferenciados, con algunos cambios localizados en sitios de unión

de factores de transcripción, como el Factor-G6 y NF-E2, que podrían explicar las diferencias encontradas en los patrones de expresión transcripcional de este gen (Figura 15).

Puesto que los tumores que se estudian en esta tesis resultan de la inducción con radiación gamma, en los ensayos funcionales con luciferasa se utilizó no solo la aproximación clásica de activación del promotor con PMA/Ionóforo, sino también la activación mediante una dosis de radiación gamma similar a la utilizada en los estudios de expresión *in vivo*, es decir, 10 Gy. Los resultados evidenciaron que tanto el promotor de *Fas* como el de *FasL* respondían de manera similar (aunque con diferente intensidad) con ambos procedimientos de activación, registrándose una respuesta diferencial significativa entre haplotipos. Por tanto se podría afirmar que las diferencias encontradas en las secuencias promotoras de las distintas cepas podrían ser responsables, al menos en parte, de las diferencias detectadas en la expresión de los dos genes *in vivo* después de los tratamientos con radiación. La correlación entre la actividad promotora y estas diferencias de expresión se determinó mediante un análisis de regresión lineal (Figuras 10 y 16). Estos resultados nos permiten proponer que las variantes nucleotídicas encontradas en los promotores de *Fas* (Villa-Morales et al., 2006) y *FasL* definen variantes alélicas responsables de la modulación del fenotipo de resistencia/susceptibilidad a la inducción de linfomas tímicos con radiación gamma.

#### **4.- El sistema *Fas/FasL* de la cepa resistente es más efectivo en la inducción de apoptosis.**

Una vez demostrada la importancia de los polimorfismos funcionales en las regiones promotoras de *Fas* y *FasL*, el siguiente paso fue analizar la contribución de las secuencias codificantes de ambos genes a la actividad biológica del sistema *Fas/FasL*. El análisis comparativo de la secuencia nucleotídica de las regiones codificantes de ambos genes evidenció la existencia de un elevado número de polimorfismos en los cDNAs de *Fas* y de *FasL* entre C57BL/6J y SEG/Pas (24 cambios nucleotídicos en el caso de *Fas*, y 12 en el caso de *FasL*.) algunos de ellos afectando a la secuencia de aminoácidos (Figuras 17 y 18).

En el caso de *Fas*, entre los doce cambios de aminoácido que se observaron en la región extracelular, siete se localizaban en el dominio CRD1 (dominio rico en cisteínas 1), tres en el dominio CRD2 y dos en el CRD3. La importancia de esta región radica en que CRD1 es el dominio implicado en la formación del dominio de ensamblaje pre-ligando (PLAD) (Chan et al., 2000; Golstein, 2000; Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000b), mientras que CRD2 y CRD3 están implicados en la interacción entre *Fas* y *FasL*. Y, lo que resulta más interesante, el residuo P134, que presenta la variación P134S, parece ser un aminoácido crítico en la interacción con *FasL* (Schneider et al., 1997; Starling et al., 1997; Starling et al., 1998).

Por otro lado, se sabe que la región intracelular de *Fas* contiene el dominio de muerte (DD) esencial para la señalización apoptótica puesto que la interacción entre *Fas* y FADD (y por tanto la formación del complejo de señalización inductora de muerte, DISC) se produce a través de este dominio. Según lo publicado, la interacción entre los dominios de muerte de *Fas* y FADD ocurre a través de los subdominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Pues bien, entre los cinco cambios de aminoácidos que hemos detectado en la región intracelular de *Fas*, dos de ellos están localizados dentro del dominio DD (concretamente en el subdominio  $\alpha 3$ ) y al menos uno de ellos (M255I) corresponde a un aminoácido demostradamente crítico en la interacción con FADD (Jeong et al., 1999). Además, la importancia de los aminoácidos situados en el DD queda patente en otros artículos que propusieron la existencia de una asociación entre una mutación puntual en el dominio DD de *Fas*, y la aparición de trastornos como el síndrome autoinmune linfoproliferativo (ALPS), algunos linfomas de células T, y la enfermedad de Hodgkin en humanos (Peters et al., 1999).

En el caso de *FasL*, se identificaron dos polimorfismos en su región intracelular que suponen el cambio de sendos aminoácidos, y en la región extracelular (mediante la cual *FasL* interacciona con *Fas*) se hallaron cuatro cambios, dos de los cuales se sabe que son funcionales (T184A, E218G) por su incidencia demostrada en la efectividad biológica del sistema *Fas/FasL* (Kayagaki et al., 1997). La razón última es que el bucle D-E, donde se ubican los dos aminoácidos, está directamente implicado en el contacto entre el ligando y el receptor, y por tanto la sustitución de la glicina 218 por un ácido glutámico produce un cambio de conformación en el bucle, que supone la pérdida parcial del contacto con el receptor, es decir, una disminución de la afinidad con que el ligando

se une al receptor, y por tanto la reducción de la actividad citotóxica del sistema en la variante E218. En nuestro caso, la cepa susceptible C57BL/6J es la portadora de la variante E218, mientras que la cepa resistente SEG/Pas tiene la variante G218. Por consiguiente, sería razonable pensar que C57BL/6J tiene un sistema Fas/FasL significativamente menos eficaz.

Para determinar si estos cambios de aminoácido son efectivamente capaces de modular la actividad biológica del sistema Fas/FasL, se hizo un análisis comparativo *in vitro* de la capacidad de los sistemas de cada cepa para inducir la señal apoptótica, midiendo la activación de caspasa-8 en combinaciones homólogas y heterólogas de células HEK-293T transfectadas con las secuencias codificantes de ambos genes (Figura 19). Los resultados obtenidos demuestran que el sistema Fas/FasL derivado de SEG/Pas es mucho más eficiente que el derivado de C57BL/6J, con una diferencia en la cantidad de caspasa-8 activada de en torno al 100%. Esto demostraría la relevancia fisiológica de los cambios de aminoácido mencionados previamente, y apoyaría la idea de que los ratones de la cepa SEG/Pas son capaces de ejecutar la vía de apoptosis dependiente de Fas de una manera más eficaz que los ratones C57BL/6J.

Estos resultados fueron confirmados mediante *Western-blotting* con anticuerpos contra la caspasa-8. También se utilizaron anticuerpos contra la caspasa-3, para estimar los niveles apoptóticos inducidos tanto por la vía extrínseca como por la intrínseca. Los resultados de estas nuevas aproximaciones corroboran los obtenidos anteriormente con el ensayo de Caspase-Glo 8, confirmándose por tanto la funcionalidad de los polimorfismos hallados en las secuencias codificantes de *Fas* y de *FasL*, y la mayor eficacia del sistema Fas/FasL en la cepa SEG/Pas (Figura 20).

Teniendo en cuenta la cantidad de sustituciones nucleotídicas que implican un cambio de aminoácido detectadas, quedaría aún por valorar la contribución relativa de cada cambio de aminoácido y de cada uno de los dominios o regiones concretas (extra- e intracelular) en la eficacia del sistema Fas/FasL. Como ya se ha mencionado previamente, los modelos moleculares y los ensayos funcionales realizados por otros autores han evidenciado ya la implicación funcional de algunos de los polimorfismos encontrados en la formación del PLAD, la interacción entre Fas y FasL, o la interacción entre Fas y FADD. Dado que cada región tiene su importancia relativa en esta vía de

señalización apoptótica, la efectividad del sistema en cada cepa podría deberse a algunos de los polimorfismos hallados, o bien al haplotipo resultante conformado por todos ellos. Para valorar la incidencia de cada uno de los polimorfismos, harían falta estudios con quimeras que centren la importancia bien en la región intracelular o extracelular de una u otra molécula, y a continuación el análisis de mutaciones puntuales por mutagénesis dirigida, para estudiar cada polimorfismo en concreto. No obstante, el procedimiento seguido en esta tesis nos ha permitido valorar el efecto del conjunto de todos los polimorfismos (haplotipos funcionales) y afirmar que las secuencias codificantes de Fas y FasL cifran variantes proteicas con diferente capacidad de inducción de la vía apoptótica intrínseca.

Teniendo en cuenta los datos derivados de los análisis de expresión y de la inducción de la vía apoptótica con las secuencias codificantes, nuestros resultados sugieren la existencia de dos mecanismos superpuestos de regulación del sistema Fas/FasL que explicarían, al menos en parte, los diferentes fenotipos de resistencia/susceptibilidad al desarrollo de los linfomas tímicos inducidos por radiación gamma:

1.- Por un lado, un mecanismo de regulación de carácter cuantitativo, relacionado con las variantes funcionales encontradas en los promotores de *Fas* y de *FasL*, que actuaría produciendo niveles distintos de expresión transcripcional de ambas moléculas en las diferentes cepas.

2.- Por otro lado, un mecanismo de regulación de carácter cualitativo, relacionado con los polimorfismos funcionales detectados en las secuencias codificantes de *Fas* y de *FasL*, que actuaría a través de la producción de proteínas diferentes con importantes consecuencias funcionales en la capacidad de inducir apoptosis por parte del sistema Fas/FasL.

El hecho de que la expresión de *Fas* y de *FasL* en el timo se estimule por irradiación- $\gamma$ , y de que la expresión de ambos sea apenas perceptible en linfomas linfoblásticos de células T, apoya sustancialmente el papel crítico de este sistema en la modulación de la linfomagénesis. Además, estos resultados avalan la utilización de la radioterapia como un procedimiento adecuado para el tratamiento de los tumores de células T.

## *Conclusiones*



1. El análisis de los patrones de expresión transcripcional *in vivo* de *Fas* y *FasL*, mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, en timos de ratones no tratados y tratados con una sola dosis letal de radiación gamma o con cuatro dosis subletales, demuestra que ambos genes responden inmediatamente a la radiación, que mantienen unos niveles altos en los ratones que se resisten a la inducción de linfomas, y que su expresión es prácticamente inexistente en los linfomas tímicos. Por tanto, el sistema *Fas/FasL* podría constituir una barrera defensiva paliando los daños de la radiación para evitar la transformación celular.
2. El comportamiento paralelo de ambos genes constituye un hecho singular que diferencia a los linfomas de la situación descrita en tumores sólidos en los que se suelen detectar niveles elevados de *FasL* y reducidos de *Fas*.
3. La predisposición a sufrir este tipo de linfomas no requiere la presencia de alelos mutados de *Fas* o *FasL*, bastando con unos niveles de expresión reducidos de los alelos salvajes por debajo de un determinado umbral.
4. Las variaciones en los niveles de expresión de *Fas* y *FasL* corren paralelas al grado de susceptibilidad de las cepas de ratón estudiadas, y se podrían explicar por la existencia de polimorfismos funcionales en sus regiones promotoras demostrados mediante ensayos de luciferasa en células Jurkat.
5. El análisis comparativo de la secuencia nucleotídica de las regiones codificantes de ambos genes evidenció la existencia de un elevado número de variaciones entre las cepas C57BL/6J y SEG/Pas. El enfrentamiento de células HEK humanas transfectadas con las secuencias codificantes de *Fas* y *FasL* de las dos cepas mencionadas en todas las combinaciones posibles, demostró que las variaciones encontradas pueden afectar a la capacidad del sistema *Fas/FasL* para inducir apoptosis. La combinación de células transfectadas con las secuencias del receptor y el ligando de la cepa más resistente (SEG/Pas) resultó ser mucho más eficiente activando las caspasas 8 y 3 (ensayo de Caspase-8 Glo y WB) que la constituida por los elementos de la cepa más sensible C57BL/6J. Las combinaciones heterólogas mostraron niveles intermedios de activación.

6. Estos resultados sugieren la existencia de dos mecanismos superpuestos de regulación del sistema Fas/FasL que podrían explicar, al menos en parte, las diferencias en el grado de susceptibilidad de las cepas. Por un lado, un mecanismo de regulación de carácter cuantitativo, relacionado con las variantes funcionales encontradas en los promotores, que actuaría produciendo niveles distintos de expresión transcripcional de ambas moléculas en las diferentes cepas. Por otro lado, un mecanismo de regulación de carácter cualitativo, relacionado con los polimorfismos funcionales detectados en las secuencias codificantes, que actuaría mediante la producción de proteínas con una capacidad diferencial para inducir apoptosis.

7. El hecho de que la expresión de *Fas* y de *FasL* en el timo se estimule por radiación- $\gamma$ , y que la expresión de ambos sea apenas perceptible en linfomas linfoblásticos de células T, avalarían la utilización de la radioterapia como un procedimiento adecuado para el tratamiento de los linfomas de células T.

## *Bibliografía*

Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R., and Nagata, S. (1993). Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1756-1760.

Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S., and Sekaly, R. P. (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 190, 1879-1890.

Algeciras-Schimnich, A., and Peter, M. E. (2003). Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett* 546, 185-188.

Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K., and Peter, M. E. (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22, 207-220.

Balmain, A., Gray, J., and Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 33 Suppl, 238-244.

Barnhart, B. C., Alappat, E. C., and Peter, M. E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.

Barnhart, B. C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G., and Peter, M. E. (2004). CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *Embo J* 23, 3175-3185.

Baumann, S., Krueger, A., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2002). Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med* 2, 257-272.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-7798.

Booker, J. K., Reap, E. A., and Cohen, P. L. (1998). Expression and function of Fas on cells damaged by gamma-irradiation in B6 and B6/lpr mice. *J Immunol* 161, 4536-4541.

Botti, C., Buglioni, S., Benevolo, M., Giannarelli, D., Papaldo, P., Cognetti, F., Vici, P., Di Filippo, F., Del Nonno, F., Venanzi, F. M., *et al.* (2004). Altered expression of FAS system is related to adverse clinical outcome in stage I-II breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 10, 1360-1365.

Castro, J. E., Listman, J. A., Jacobson, B. A., Wang, Y., Lopez, P. A., Ju, S., Finn, P. W., and Perkins, D. L. (1996). Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 5, 617-627.

Cohen, P. L., and Eisenberg, R. A. (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 9, 243-269.

Crist, S. A., Griffith, T. S., and Ratliff, T. L. (2003). Structure/function analysis of the murine CD95L promoter reveals the identification of a novel transcriptional repressor and functional CD28 response element. *J Biol Chem* 278, 35950-35958.

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.

Chan, H., Bartos, D. P., and Owen-Schaub, L. B. (1999). Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol* 19, 2098-2108.

Chervonsky, A. V., Wang, Y., Wong, F. S., Visintin, I., Flavell, R. A., Janeway, C. A., Jr., and Matis, L. A. (1997). The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 89, 17-24.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.

Chun, D. H., Jung, K. C., Park, W. S., Lee, I. S., Choi, W. J., Kim, C. J., Park, S. H., and Bae, Y. (2000). Costimulatory effect of Fas in mouse T lymphocytes. *Mol Cells* 10, 642-646.

D'Souza, S. D., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N. R., Barker, P. A., Troutt, A. B., Raine, C. S., and Antel, J. P. (1996). Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 184, 2361-2370.

Debatin, K. M., Suss, D., and Krammer, P. H. (1994). Differential expression of APO-1 on human thymocytes: implications for negative selection? *Eur J Immunol* 24, 753-758.

Demant, P. (2003). Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nat Rev Genet* 4, 721-734.

DeRyckere, D., Mann, D. L., and DeGregori, J. (2003). Characterization of transcriptional regulation during negative selection in vivo. *J Immunol* 171, 802-811.

Dowling, P., Shang, G., Raval, S., Menonna, J., Cook, S., and Husar, W. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 184, 1513-1518.

Dragani, T. A., Manenti, G., Gariboldi, M., De Gregorio, L., and Pierotti, M. A. (1995). Genetics of liver tumor susceptibility in mice. *Toxicol Lett* 82-83, 613-619.

Drappa, J., Vaishnav, A. K., Sullivan, K. E., Chu, J. L., and Elkon, K. B. (1996). Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 335, 1643-1649.

Fernandez-Piqueras, J., and Santos, J. (2002). Tumor modifier genes. *Rev Oncol* 4, 349-357.

Feuk, L., Prince, J. A., Blennow, K., and Brookes, A. J. (2003). Further evidence for role of a promoter variant in the TNFRSF6 gene in Alzheimer disease. *Hum Mutat* 21, 53-60.

Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., and Puck, J. M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946.

Fleck, M., Zhou, T., Tatsuta, T., Yang, P., Wang, Z., and Mountz, J. D. (1998). Fas/Fas ligand signaling during gestational T cell development. *J Immunol* 160, 3766-3775.

Fodde, R., and Smits, R. (2002). Cancer biology. A matter of dosage. *Science* 298, 761-763.

Gaur, U., and Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66, 1403-1408.

Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2, 309-322.

Giordano, C., Stassi, G., De Maria, R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R., and Galluzzo, A. (1997). Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275, 960-963.

Golstein, P. (2000). Signal transduction. FasL binds preassembled Fas. *Science* 288, 2328-2329.

Guerrero, I., and Pellicer, A. (1987). Mutational activation of oncogenes in animal model systems of carcinogenesis. *Mutat Res* 185, 293-308.

Herranz, M., Santos, J., Salido, E., Fernandez-Piqueras, J., and Serrano, M. (1999). Mouse p73 gene maps to the distal part of chromosome 4 and might be involved in the progression of gamma-radiation-induced T-cell lymphomas. *Cancer Res* 59, 2068-2071.

Hettmann, T., DiDonato, J., Karin, M., and Leiden, J. M. (1999). An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 189, 145-158.

Hettmann, T., and Leiden, J. M. (2000). NF-kappa B is required for the positive selection of CD8+ thymocytes. *J Immunol* 165, 5004-5010.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.

Hoogendoorn, B., Coleman, S. L., Guy, C. A., Smith, K., Bowen, T., Buckland, P. R., and O'Donovan, M. C. (2003). Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet* 12, 2249-2254.

Ichikawa, H., Ota, K., and Iwata, M. (1996). Increased Fas antigen on T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 71, 125-129.

Itoh, N., Imagawa, A., Hanafusa, T., Waguri, M., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Moriwaki, M., Nakajima, H., Miyagawa, J., Namba, M., *et al.* (1997). Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 186, 613-618.

Jeong, E. J., Bang, S., Lee, T. H., Park, Y. I., Sim, W. S., and Kim, K. S. (1999). The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. *J Biol Chem* 274, 16337-16342.

Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nagao, F., Matsuo, S., Maeda, H., Okumura, K., and Yagita, H. (1997). Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3914-3919.

Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J., and Budd, R. C. (1999). Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 190, 1891-1896.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.

Kishimoto, H., and Sprent, J. (1997). Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 185, 263-271.

Kishimoto, H., Surh, C. D., and Sprent, J. (1998). A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 187, 1427-1438.

Kong, L., Ogawa, N., Nakabayashi, T., Liu, G. T., D'Souza, E., McGuff, H. S., Guerrero, D., Talal, N., and Dang, H. (1997). Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 40, 87-97.

Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.

Krueger, A., Fas, S. C., Baumann, S., and Krammer, P. H. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193, 58-69.

Kurasawa, K., Hashimoto, Y., and Iwamoto, I. (1999). Fas modulates both positive and negative selection of thymocytes. *Cell Immunol* 194, 127-135.

Lai, H. C., Sytwu, H. K., Sun, C. A., Yu, M. H., Yu, C. P., Liu, H. S., Chang, C. C., and Chu, T. Y. (2003). Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 103, 221-225.

Landowski, T. H., Moscinski, L., Burke, R., Buyuksal, I., Painter, J. S., Goldstein, S., and Dalton, W. S. (2001). CD95 antigen mutations in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 42, 835-846.

Latinis, K. M., Norian, L. A., Eliason, S. L., and Koretzky, G. A. (1997). Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* 272, 31427-31434.

Lee, H. O., and Ferguson, T. A. (2003). Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 325-335.

Lee, K. H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schutze, S., Peter, M. E., and Chan, A. C. (2006). The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo J* 25, 1009-1023.

Legembre, P., Barnhart, B. C., Zheng, L., Vijayan, S., Straus, S. E., Puck, J., Dale, J. K., Lenardo, M., and Peter, M. E. (2004). Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep* 5, 1084-1089.

Lemaire, C., Andreau, K., Souvannavong, V., and Adam, A. (1998). Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Lett* 425, 266-270.



Li-Weber, M., and Krammer, P. H. (2003). Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* 15, 145-157.

Maas, K., Westfall, M., Pietenpol, J., Olsen, N. J., and Aune, T. (2005). Reduced p53 in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis is associated with loss of radiation-induced apoptosis. *Arthritis Rheum* 52, 1047-1057.

Malumbres, M., Perez de Castro, I., Santos, J., Melendez, B., Manges, R., Serrano, M., Pellicer, A., and Fernandez-Piqueras, J. (1997). Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas. *Oncogene* 14, 1361-1370.

Manenti, G., Falvella, F. S., Gariboldi, M., Dragani, T. A., and Pierotti, M. A. (1995). Different susceptibility to lung tumorigenesis in mice with an identical Kras2 intron 2. *Genomics* 29, 438-444.

Mao, J. H., Saunier, E. F., de Koning, J. P., McKinnon, M. M., Higgins, M. N., Nicklas, K., Yang, H. T., Balmain, A., and Akhurst, R. J. (2006). Genetic variants of Tgfb1 act as context-dependent modifiers of mouse skin tumor susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8125-8130.

Marin, M., Tailor, C. S., Nouri, A., Kozak, S. L., and Kabat, D. (1999). Polymorphisms of the cell surface receptor control mouse susceptibilities to xenotropic and polytropic leukemia viruses. *J Virol* 73, 9362-9368.

Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A., and Ju, S. T. (1998). Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol* 161, 3469-3473.

Matsui, K., Xiao, S., Fine, A., and Ju, S. T. (2000). Role of activator protein-1 in TCR-mediated regulation of the murine fasl promoter. *J Immunol* 164, 3002-3008.

McClure, R. F., Heppelmann, C. J., and Paya, C. V. (1999). Constitutive Fas ligand gene transcription in Sertoli cells is regulated by Sp1. *J Biol Chem* 274, 7756-7762.

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-2804.

Melendez, B., Santos, J., and Fernandez-Piqueras, J. (1999). Loss of heterozygosity at the proximal-mid part of mouse chromosome 4 defines two novel tumor suppressor gene loci in T-cell lymphomas. *Oncogene* 18, 4166-4169.

Moulian, N., and Berrih-Aknin, S. (1998). Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin Immunol* 10, 449-456.

Moulian, N., Bidault, J., Planche, C., and Berrih-Aknin, S. (1998). Two signaling pathways can increase fas expression in human thymocytes. *Blood* 92, 1297-1307.

Moulian, N., Bidault, J., Truffault, F., Yamamoto, A. M., Levasseur, P., and Berrih-Aknin, S. (1997). Thymocyte Fas expression is dysregulated in myasthenia gravis patients with anti-acetylcholine receptor antibody. *Blood* 89, 3287-3295.

Muschen, M., Warskulat, U., and Beckmann, M. W. (2000). Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med* 78, 312-325.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

Mysler, E., Bini, P., Drappa, J., Ramos, P., Friedman, S. M., Krammer, P. H., and Elkon, K. B. (1994). The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 93, 1029-1034.

Nagase, H., Bryson, S., Fee, F., and Balmain, A. (1996). Multigenic control of skin tumour development in mice. *Ciba Found Symp* 197, 156-168; discussion 168-180.

Nagase, H., Mao, J. H., and Balmain, A. (1999). A subset of skin tumor modifier loci determines survival time of tumor-bearing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15032-15037.

Nagase, H., Mao, J. H., and Balmain, A. (2003). Allele-specific Hras mutations and genetic alterations at tumor susceptibility loci in skin carcinomas from interspecific hybrid mice. *Cancer Res* 63, 4849-4853.

Nagase, H., Mao, J. H., de Koning, J. P., Minami, T., and Balmain, A. (2001). Epistatic interactions between skin tumor modifier loci in interspecific (spretus/musculus) backcross mice. *Cancer Res* 61, 1305-1308.

Nagata, S. (1996). Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality. *Genes Cells* 1, 873-879.

Newcomb, E. W., Steinberg, J. J., and Pellicer, A. (1988). ras oncogenes and phenotypic staging in N-methylnitrosourea- and gamma-irradiation-induced thymic lymphomas in C57BL/6J mice. *Cancer Res* 48, 5514-5521.

- Ohsako, S., Hara, M., Harigai, M., Fukasawa, C., and Kashiwazaki, S. (1994). Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 73, 109-114.
- Oukka, M., Ho, I. C., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 9, 295-304.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A., and Ruberti, G. (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274, 38241-38250.
- Pensati, L., Costanzo, A., Ianni, A., Accapezzato, D., Iorio, R., Natoli, G., Nisini, R., Almerighi, C., Balsano, C., Vajro, P., *et al.* (1997). Fas/Apo1 mutations and autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with type 2 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 113, 1384-1389.
- Peter, M. E., Heufelder, A. E., and Hengartner, M. O. (1997). Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12736-12737.
- Peter, M. E., Legembre, P., and Barnhart, B. C. (2005). Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochim Biophys Acta* 1755, 25-36.
- Peters, A. M., Kohfink, B., Martin, H., Griesinger, F., Wormann, B., Gahr, M., and Roesler, J. (1999). Defective apoptosis due to a point mutation in the death domain of CD95 associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome, T-cell lymphoma, and Hodgkin's disease. *Exp Hematol* 27, 868-874.
- Pinkoski, M. J., and Green, D. R. (1999). Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ* 6, 1174-1181.
- Rathmell, J. C., and Thompson, C. B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl, S97-107.
- Reap, E. A., Roof, K., Maynor, K., Borrero, M., Booker, J., and Cohen, P. L. (1997). Radiation and stress-induced apoptosis: a role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5750-5755.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., and de Villartay, J. P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.

Santarosa, M., and Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654, 105-122.

Santos, J., Herranz, M., Fernandez, M., Vaquero, C., Lopez, P., and Fernandez-Piqueras, J. (2001). Evidence of a possible epigenetic inactivation mechanism operating on a region of mouse chromosome 19 in gamma-radiation-induced thymic lymphomas. *Oncogene* 20, 2186-2189.

Santos, J., Montagutelli, X., Acevedo, A., Lopez, P., Vaquero, C., Fernandez, M., Arnau, M. R., Szatanik, M., Salido, E., Guenet, J. L., and Fernandez-Piqueras, J. (2002). A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice. *Oncogene* 21, 6680-6683.

Santos, J., Perez de Castro, I., Herranz, M., Pellicer, A., and Fernandez-Piqueras, J. (1996). Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumor suppressor gene region of about 0.6 cM in gamma-radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. *Oncogene* 12, 669-676.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.

Scheller, C., Sopper, S., Ehrhardt, C., Flory, E., Chen, P., Koutsilieris, E., Ludwig, S., ter Meulen, V., and Jassoy, C. (2002). Caspase inhibitors induce a switch from apoptotic to proinflammatory signaling in CD95-stimulated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 32, 2471-2480.

Schmitz, I., Clayton, L. K., and Reinherz, E. L. (2003a). Gene expression analysis of thymocyte selection in vivo. *Int Immunol* 15, 1237-1248.

Schmitz, I., Krueger, A., Baumann, S., Schulze-Bergkamen, H., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2003b). An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* 171, 2930-2936.

Schneider, P., Bodmer, J. L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Tersikh, A., Peitsch, M. C., and Tschopp, J. (1997). Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem* 272, 18827-18833.

Sibley, K., Rollinson, S., Allan, J. M., Smith, A. G., Law, G. R., Roddam, P. L., Skibola, C. F., Smith, M. T., and Morgan, G. J. (2003). Functional FAS promoter

polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 63, 4327-4330.

Siegel, R. M., Chan, F. K., Chun, H. J., and Lenardo, M. J. (2000a). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1, 469-474.

Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000b). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.

Soubrane, C., Mouawad, R., Antoine, E. C., Verola, O., Gil-Delgado, M., and Khayat, D. (2000). A comparative study of Fas and Fas-ligand expression during melanoma progression. *Br J Dermatol* 143, 307-312.

Starling, G. C., Bajorath, J., Emswiler, J., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., and Kiener, P. A. (1997). Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas. *J Exp Med* 185, 1487-1492.

Starling, G. C., Kiener, P. A., Aruffo, A., and Bajorath, J. (1998). Analysis of the ligand binding site in Fas (CD95) by site-directed mutagenesis and comparison with TNFR and CD40. *Biochemistry* 37, 3723-3726.

Stassi, G., De Maria, R., Trucco, G., Rudert, W., Testi, R., Galluzzo, A., Giordano, C., and Trucco, M. (1997). Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 186, 1193-1200.

Sun, T., Miao, X., Zhang, X., Tan, W., Xiong, P., and Lin, D. (2004). Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96, 1030-1036.

Sun, T., Zhou, Y., Li, H., Han, X., Shi, Y., Wang, L., Miao, X., Tan, W., Zhao, D., Zhang, X., *et al.* (2005). FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med* 202, 967-974.

Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76, 969-976.

To, M. D., Perez-Losada, J., Mao, J. H., Hsu, J., Jacks, T., and Balmain, A. (2006). A functional switch from lung cancer resistance to susceptibility at the Pas1 locus in Kras2LA2 mice. *Nat Genet* 38, 926-930.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188, 919-930.

Villa-Morales, M., Santos, J., and Fernandez-Piqueras, J. (2006). Functional Fas (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to gamma-radiation-induced thymic lymphoma. *Oncogene* 25, 2022-2029.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.

Vonarbourg, C., Stolzenberg, M. C., Holzlova, E., Fischer, A., Deist, F. L., and Rieux-Laucat, F. (2002). Differential sensitivity of Jurkat and primary T cells to caspase-independent cell death triggered upon Fas stimulation. *Eur J Immunol* 32, 2376-2384.

Waldner, H., Sobel, R. A., Howard, E., and Kuchroo, V. K. (1997). Fas- and FasL-deficient mice are resistant to induction of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 159, 3100-3103.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.

Wu, J., Metz, C., Xu, X., Abe, R., Gibson, A. W., Edberg, J. C., Cooke, J., Xie, F., Cooper, G. S., and Kimberly, R. P. (2003). A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 170, 132-138.

Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P. H., and Mountz, J. D. (1996). Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 98, 1107-1113.

Yamamoto, H., Imai, K., and Perucho, M. (2002). Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *J Gastroenterol* 37, 153-163.

Yonehara, S., Nishimura, Y., Kishil, S., Yonehara, M., Takazawa, K., Tamatani, T., and Ishii, A. (1994). Involvement of apoptosis antigen Fas in clonal deletion of human thymocytes. *Int Immunol* 6, 1849-1856.

Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300.

Zhang, J., Miranda, K., Ma, B. Y., and Fine, A. (2000). Molecular characterization of the mouse Fas ligand promoter in airway epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1490, 291-301.

Zhang, X., Miao, X., Sun, T., Tan, W., Qu, S., Xiong, P., Zhou, Y., and Lin, D. (2005). Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to risk of lung cancer. *J Med Genet* 42, 479-484.

Zheng, Y., Ouaz, F., Bruzzo, P., Singh, V., Gerondakis, S., and Beg, A. A. (2001). NF-kappa B RelA (p65) is essential for TNF-alpha-induced fas expression but dispensable for both TCR-induced expression and activation-induced cell death. *J Immunol* 166, 4949-4957.

*Anexo*



## ORIGINAL ARTICLE

**Functional *Fas* (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphoma**

M Villa-Morales, J Santos and J Fernández-Piqueras

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

The Fas death receptor is a cell surface molecule involved in apoptosis as well as in proliferative or activating signals of many cells types, including T lymphocytes. Using quantitative real-time reverse transcription–PCR analysis, we confirm that expression of this gene is scarcely perceptible in thymic lymphomas induced by  $\gamma$ -irradiation in C57BL/6J mice. Notably, we also demonstrate for the first time that *Fas* expression is significantly upregulated *in vivo* both after single high dose of radiation and in thymic lymphoma-free mice. In addition, we determined its levels of expression in five mouse strains exhibiting different degrees of susceptibility (SPRET/Ei, SEG/Pas, BALB/cJ, C57BL/6J and RF/J). Interestingly, we found the highest levels of expression in SPRET/Ei and SEG/Pas strains (both derived from the *Mus spretus* species), which are known to have the most resistant phenotype, and the lowest levels in the most susceptible strains C57BL/6J and RF/J. DNA sequencing of the *Fas* promoter in all five strains showed many polymorphisms that can be classified into three functional haplotypes by using luciferase assays: (1) C57BL/6J and RF/J, (2) BALB/cJ and (3) SPRET/Ei and SEG/Pas. Promoter activities in response to single high doses of radiation correlated well with the levels of *Fas* expression and are consistent with the degree of strain susceptibility.

*Oncogene* (2006) 25, 2022–2029. doi:10.1038/sj.onc.1209234; published online 21 November 2005

**Keywords:** Fas (Apo-1/CD95); functional polymorphisms; cancer-genetic-susceptibility; thymic lymphoma

**Introduction**

The *Fas* gene (also known as *Apo-1* or *CD95*) is a death domain-containing member of the tumour necrosis factor receptor (TNFR) superfamily. Binding of this gene product to its ligand (Fas-L) triggers apoptosis involved

in the removal of autoreactive lymphocytes during normal development in the immune system. The *Fas*/*Fas-ligand* system can also transduce proliferative or activating signals (Siegel *et al.*, 2000). Consistent with these functions, alterations in the *Fas*/*Fas-ligand* system have been implicated in the pathogenesis of many tumour types as well as in some diseases of the immune system (Krammer, 2000).

While there is no doubt that Fas may regulate peripheral lymphoid apoptosis or activation, there exist conflicting results regarding its role in thymocyte development (Rathmell and Thompson, 2002). Favouring the hypothesis of a role for Fas in thymocyte development, several independent papers have provided evidence for the involvement of Fas/*Fas-ligand* interaction in negative and/or positive selection of thymocytes during early thymic development in gestation and in negative selection of thymocytes in adult mice depending on the dose of the antigen (Castro *et al.*, 1996; Fleck *et al.*, 1998; Kishimoto *et al.*, 1998; Kurasawa *et al.*, 1999). Still, in peripheral T cells, stress from ionizing radiation exposure has been shown to lead to Fas/*Fas-L* activation and subsequent apoptosis (Reap *et al.*, 1997; Booker *et al.*, 1998; Pinkoski and Green, 1999), although the role of this system in eliminating thymocytes inside the thymus of irradiated mice remains elusive.

In a previous paper, we demonstrated that mouse thymic lymphomas induced by  $\gamma$ -irradiation expressed lower levels of *Fas* mRNA than those found in control thymuses, suggesting that a silencing of this gene may contribute to the development of such tumours (Santos *et al.*, 2001). In addition, using a panel of interspecific chromosome substitution strains between *Mus spretus* (SEG/Pas) and C57BL/6J, we have recently identified a thymic lymphoma-resistance locus (*Tlyr1*) on chromosome 19 that includes *Fas* as a putative candidate gene for tumour resistance (Santos *et al.*, 2002). Within such a context, it is worth noting that the risk of developing acute myeloid leukaemia (AML) has been associated with a polymorphism in the human *FAS* promoter, which affects an SP1-binding site (Sibley *et al.*, 2003).

Keeping in mind these considerations, the aim of the present paper was initially to analyse the levels of transcriptional gene expression of *Fas* in thymuses from C57BL/6J mice treated with different doses of

Correspondence: Professor J Fernández-Piqueras Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.  
E-mail: jf.piqueras@uam.es

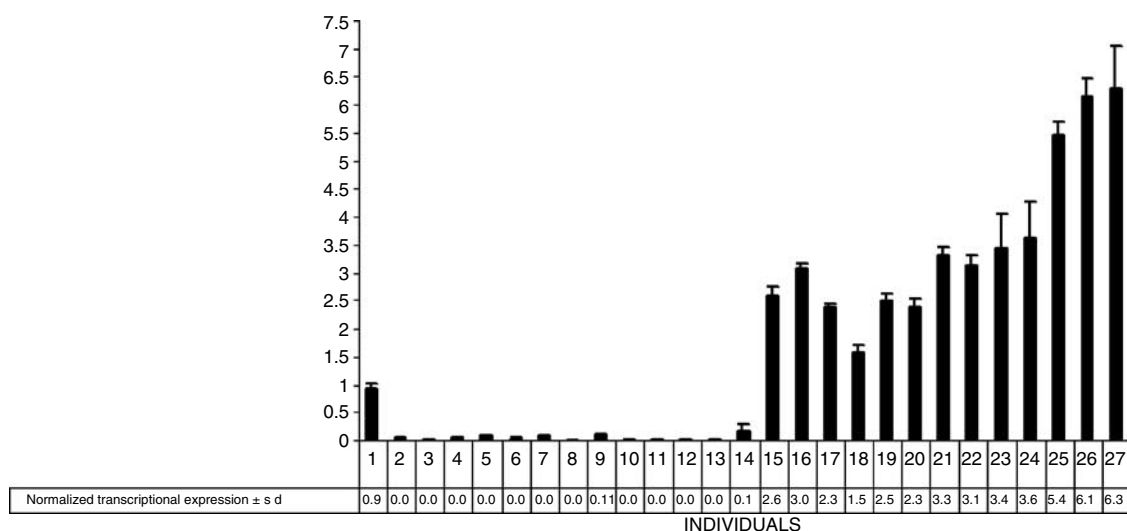
Received 22 July 2005; revised 16 September 2005; accepted 11 October 2005; published online 21 November 2005

$\gamma$ -radiation to assess the implication of the *Fas/Fas-L* system in both the response of thymocytes to damage caused by radiation and thymic lymphoma development. Afterwards, we performed an analysis of *Fas* expression with thymuses from five mouse inbred strains exhibiting differences in their degree of susceptibility to  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas. Our results revealed a significant *in vivo* increase of *Fas* mRNA expression in thymuses after single high doses of  $\gamma$ -irradiation and thymuses of mice that did not develop the tumour after four weekly sublethal doses of radiation, together with a significant decrease in thymic lymphomas. Remarkably significant differences between thymus expression levels of strains showing differential susceptibility to tumour induction were detected. Sequencing of the *Fas* promoter in these strains evidenced many polymorphisms that allowed us to define three functional haplotypes through luciferase assays. Interestingly, we observed a correlation between the increase of the promoter activity and the diminishing susceptibility of mouse strains. These results are discussed in relation to the possible involvement of allele *Fas* variants in modulating the phenotypes of resistance/susceptibility to  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas in mouse inbred strains.

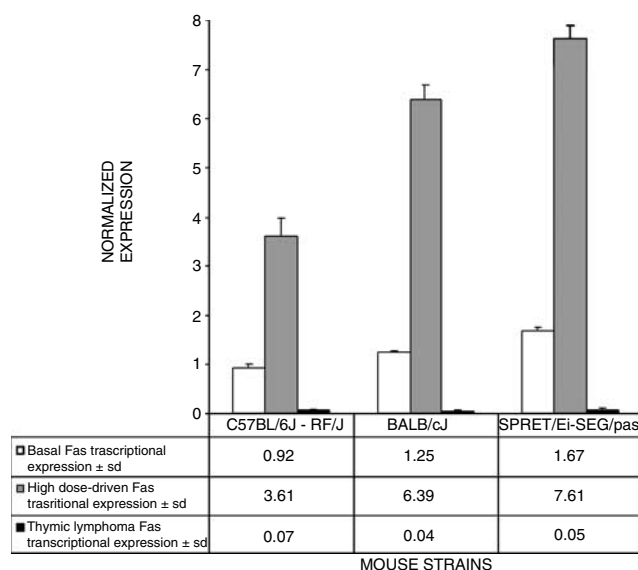
## Results

**Transcriptional expression analysis of *Fas* in the thymus** Sets of 30 individuals from the C57BL/6J, RF/J, BALB/cJ, SPRET/Ei and SEG/Pas mouse strains were taken for this work. Of these, five mice from each strain were treated with lethal doses of radiation (10 Gy), the remaining individuals being subjected to four weekly sublethal doses (1.75 Gy). In addition, mRNA samples from lymphomas previously induced in SPRET/Ei and SEG/Pas strains were incorporated. We have studied the

levels of *in vivo* expression of the *Fas* gene through quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) in thymuses from mice treated with lethal doses as well as in thymuses from thymic lymphoma-free and thymic lymphoma-bearing mice treated with sublethal doses of  $\gamma$ -irradiation. The results obtained from the C57BL/6J strain revealed that *Fas* expression is nearly absent in 13 out of the 13 thymic lymphomas (Figure 1), confirming previous data. Conversely, we found a significant increase in the expression in thymuses of mice 24 h after treatment with single high doses and those from tumour-free mice treated with four sublethal doses and left for a latency period of 25 weeks (Figure 1). It appears then that  $\gamma$ -radiation triggers an *in vivo* *Fas* expression inside the thymus possibly as part of a defensive response of the damaged thymocytes. The comparison of the patterns of expression in thymuses from the aforementioned strains allows one to classify them into three groups (Figure 2). The one consisting of the SPRET/Ei and SEG/Pas strains exhibited the highest levels of basal expression (mean-normalized value 1.6740, s.e. 0.03295), whereas the BALB/cJ group presented intermediate values (mean 1.2480, s.e. 0.009695) and the C57BL/6J and RF/J group showed the lowest ones (mean 0.9240, s.e. 0.03906). With regard to treatments with lethal single doses of radiation, *Fas* expression experienced a considerable increase compared to the basal values, and similar differences among the three groups of strains were observed. Once again, the SPRET/Ei group was the one exhibiting the highest levels (mean normalized value 7.61, s.e. 0.2740), whereas the BALB/cJ group had intermediate values (mean 6.39, s.e. 0.2979) and the C57BL/6J group showed the lowest ones (mean 3.61, s.e. 0.3527). All data represent an average of two independent experiments, each of them performed in triplicate. A one-way ANOVA and a Tukey comparison post test evidence significant differences among the three groups ( $P < 0.001$ ). Interestingly,



**Figure 1** Transcriptional expression of *Fas* after  $\gamma$ -radiation treatment. Normalized *Fas* transcriptional expression levels in thymuses from C57BL/6J mice: lane 1: control, not irradiated. Lanes 2–14: sublethally irradiated, thymic lymphoma. Lanes 15–23: sublethally irradiated, thymic lymphoma-free. Lanes 24–27: single high dose-irradiated, and killed after 24 h.



**Figure 2** Transcriptional expression of *Fas* in distinct strains of mice. Normalized *Fas* transcriptional expression levels in thymuses from three groups of mouse strains (C57BL/6J, BALB/cJ and SPRET/Ei) exhibiting a differential susceptibility to  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas. In addition to control values from nonirradiated thymuses, *Fas* expression levels detected in thymuses after high-single doses of radiation and in thymic lymphomas have been incorporated (see values, standard deviations and statistical analysis in the main text).

transcriptional levels of *Fas* in thymic lymphomas were extremely low and there do not exist significant differences between susceptible and resistant strains (SPRET/Ei group: mean value 0.06, s.e. 0.0439; BALB/cJ group: mean value 0.04, s.e. 0.0296; C57BL/6J group: mean value 0.07, s.e. 0.0345).

#### Polymorphisms at the *Fas* promoter regions

To determine whether these differences in the levels of expression could be attributed to variations in the promoter region, the promoters of all the strains were sequenced (GenBank Accession numbers: C57BL/6J: DQ003592; BALB/cJ: DQ003593; RF/J: DQ003594; SPRET/Ei: DQ003597; SEG/Pas: DQ003598) and compared with the sequence published for 129/svJ (Zheng *et al.*, 2001). The promoter sequence of C57BL/6J is identical to that of 129/svJ, although a considerable number of nucleotide variations among the promoters of the five analysed strains was detected that allowed their classification into haplotype groups previously defined by the expression analysis: (1) C57BL/6J and RF/J, (2) BALB/cJ and (3) SPRET/Ei and SEG/Pas (Figure 3). Using the haplotype of the C57BL/6J group as the reference, the promoter of BALB/cJ exhibited a major or critical nucleotide substitution located within a transcription factor-binding site AP1 (−375 A/G), whereas the promoter of the SPRET/Ei and SEG/Pas exhibited two major variants affecting the transcription factor-binding sites NF-AT (−964C/T) and NF- $\kappa$ B (−598Ins. C).

#### Sequence variants at *Fas* promoters involve functional polymorphisms

Having demonstrated significant differences among the DNA sequence of promoters from three groups of strains, we sought to probe the functionality of these variants (haplotypes) through Luciferase assays using PMA/Ionophore activation of JK cells. However, since our *in vivo* model consists of  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas, we also determined the level of Luciferase activity after *Fas* promoter activation using a single high dose of  $\gamma$ -irradiation. To this end, we selected a 10Gy treatment since this has been reported to be an apoptosis-inducing dose (Maas *et al.*, 2005). In order to establish the optimal incubation time point, Luciferase activity was measured in cells treated with 10Gy  $\gamma$ -irradiation and then incubated for 4, 6, 8, 10 and 24h. The time course experiment described a curve in which activation was maximal at 10 h (data not shown).

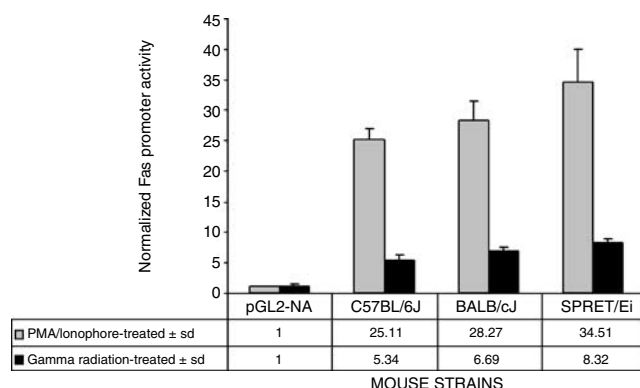
C57BL/6J and RF/J *Fas* promoters drove Luciferase transcription to either a 25.11-fold increase (PMA/Ionophore-activated JK cells) with respect to the empty plasmid in nonactivated cells (pGL2-NA) or a 5.34-fold increase in the case of  $\gamma$ -radiation-activated JK cells. The SPRET/Ei and SEG/Pas promoters on the other hand provided values of either 34.51-fold increase (for PMA/Ionophore-activated JK cells) or a 8.32-fold increase in the case of  $\gamma$ -radiation-activated JK cells. Finally, the promoter of BALB/cJ exhibited an intermediate increase of either 28.27-fold (for PMA/Ionophore-activated JK cells) or 6.96-fold in the case of  $\gamma$ -radiation-activated JK cells (Figure 4). In both cases (PMA/Ionophore- and  $\gamma$ -radiation-activated JK cells), a one-way ANOVA test revealed significant differences between the groups ( $P=0.007$  and  $0.005$ , respectively). All these results can be considered valid given that in all cases promoter activities exhibit greater than twofold increase over the basic promoterless vector (Hoogendoorn *et al.*, 2003). Data are the average for three different assays. In order to enhance comparisons, the normalized reporter activity for each promoter (Luciferase value/Renilla value) was referred to that of C57BL/6J (Figure 5). Interestingly, there does seem to exist a significant correlation between the promoter activities and the levels of mRNA *Fas* expression ( $r=0.923$  with a  $P<0.001$  when PMA/Ionophore-activated, and  $r=0.717$  with a  $P=0.003$  when  $\gamma$ -radiation-activated JK cells).

#### Discussion

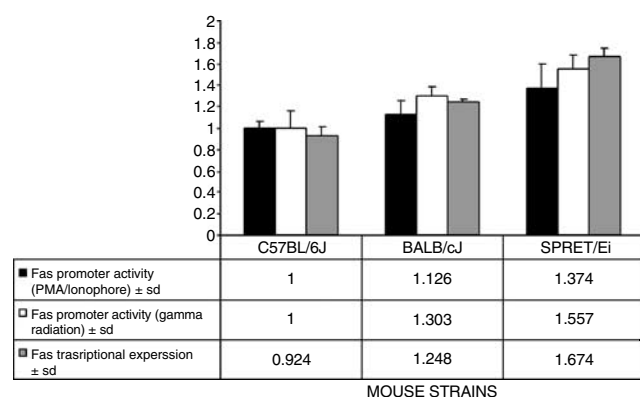
The *Fas/Fas ligand* system mediates apoptosis as well as the proliferative or activating signals that appear to be central in the regulation of peripheral tolerance (Chan *et al.*, 1999; Siegel *et al.*, 2000). Mutations in either the receptor or its ligand may induce lymphadenopathy and autoimmune diseases caused by defects in activation-induced cell death (AICD) and peripheral T- and B-cell deletion (Krammer, 2000; Rathmell and Thompson, 2002). With regard to cancer, broad evidence reveals

-1272	C57BL/6J TGTGGCATGTAGGGATGAAGGCTCTATGTAGGCACCTTCTCTGCTCTCAACTTCTCTATATCAATGAGTTGTGTGG SPRET/Ei ..... BALB/cJ .....
-1192	C57BL/6J GTCTCAGTTTGTGGGAGCAATCTATAGTCTTGGAACAGGCTGCATTGTTT <u>GGGACTCCCA</u> TGCAACTCTTTTGGCC SPRET/Ei ..... BALB/cJ .....
-1112	C57BL/6J AACGATTCAATTAGATGCAACCCCATCCAGGA <u>AGGAAAA</u> CTTCATTGATGACAAGAGATGTTCACTTGTGGCTCTGTC SPRET/Ei ...A..... BALB/cJ .....
-1032	C57BL/6J TCCCCCATTATTGGCTATAGATCACCTTCATGTATGCTTATACTTTAGGAAGACTCTGCTAG <u>GTTTCCA</u> TACCTCTCA SPRET/Ei .....A.....T..... BALB/cJ .....
-952	C57BL/6J AATGCCCTTTAATTTTAGCTGTCTCTCCCTGTATTCCCATTCATCGTCTTCTTTCCCTCCCCCACTTGATCTCCCAT SPRET/Ei .....TT.....G..T..... BALB/cJ .....
-872	C57BL/6J CATAACTACCTATTTTATTCTCTCTCTTAATAAGATCTTCTGTCCCTCCCTAGTCCCTTACTCTATATCTAACCCC SPRET/Ei .....A.....C..... BALB/cJ .....
-792	C57BL/6J CGTGGTTCTAAAGATTCTGGCTTGGTCCCTGAGTTAACTGCTGTGTTATTG <u>TCATAGTCATT</u> TACCTTCATTCTCCATT SPRET/Ei ..A..... BALB/cJ .....
-712	C57BL/6J TGGGAAACGAAGCCAGGGGACATTCCTCATCAGGATCCCAAAGCCTATTATCTCTACCTCTGCTGTGGTGATTGTCAC SPRET/Ei .....G.....G..... BALB/cJ .....
-632	C57BL/6J TTCATGTATCATATATGAGCTCTGTGGA <u>GGGACC-TCCC</u> TCATCAGAATCCTAGGGTGTGTACCTCCTCTGTGGTAATTA SPRET/Ei .....C.....A..... BALB/cJ .....
-552	C57BL/6J CCATTAGAGGCCCCAGAAAGCCCCAGCAGACCTGT <u>CAC</u> TGACAAAATATTGAAAGTGAAGGCAAAA-TGGTCTTTGTCTC SPRET/Ei ..T.....A..... BALB/cJ .....
-472	C57BL/6J CAGCAATCAGCCAAAGTCCAATTCAATACAGAGTTCAAGATTCCTTCCAGGGTGAGCAGCAGGCAGAAAAAATCTCA SPRET/Ei ..... BALB/cJ .....
-392	C57BL/6J CTTGACCTGAGGGT <u>GTGACTGTG</u> GGAAGCGCCAGGAT <u>GGGGAATGCCCA</u> TTTATGCAATCAAGCCCTGCTTGGGCCCCCT SPRET/Ei ..... BALB/cJ .....G.....
-312	C57BL/6J CCTCCCCGCCCCCACCACCCCGCTCAGGCCGCTGTGCAGTGGTGAGTCAGT <u>GGGTTTCCCC</u> GGGAGACCAGCAG SPRET/Ei ..... BALB/cJ .....
-232	C57BL/6J AACTTTCTCGCAACCCTTGGGGCTTTACGAAGATTGTGTTTGGTCCCTCAAAAGAAAAA---GTGACATACAGTGT SPRET/Ei .....C..T.....A.....AAA..... BALB/cJ .....
-152	C57BL/6J CAAAGCGATTCTGGGAAGACCTGAATAGGAGCGAAGCGGTTTGTGCGTGCCAGGGGGCGGGCCTAGGCAAAGTACATAC SPRET/Ei .....A..G.....T..... BALB/cJ .....
-72	C57BL/6J CCACAGGCAGTCTAGAGCTGGTGGGTGGGCGCGCAGGCTGCCACACAGGCCGCGCGCTGTTTCCCTGCTGCAGACATG SPRET/Ei ...G..... BALB/cJ ...G.....

**Figure 3** *Fas* promoter sequences. Only C57BL/6J, SPRET/Ei and BALB/cJ *Fas* promoter sequences are shown as representatives of the three functional haplotypes. Promoters from RF/J and SEG/Pas are 100% identical to C57BL/6J and SPRET/Ei, respectively. Numbers on the left indicate base pair position from transcriptional start site. Dots indicate sequence identity, and polymorphisms are indicated by the corresponding nucleotide. Transcription factor-binding sites are underlined and marked by the factor's name on the sequence. Polymorphisms locating in transcription factors-binding sites are marked with an asterisk.



**Figure 4** *Fas* promoter activity in activated Jurkat T cells. Fold increase is calculated as the ratio (normalized reporter activity of each promoter in activated cells/normalized reporter activity of empty pGL2 in untreated cells) (pGL2-NA, nonactivated). Normalized reporter activity is calculated as the ratio (Firefly luciferase value/Renilla luciferase value). JK cells were either treated with PMA/Ionophore or with  $\gamma$ -radiation.



**Figure 5** Comparison between *Fas* promoter activity and *Fas* transcriptional expression level. *Fas* promoter activity in activated Jurkat T cells is expressed as the ratio (normalized reporter activity of each promoter/normalized reporter activity of C57BL/6J). Normalized reporter activity is calculated as the ratio (Firefly luciferase value/Renilla luciferase value). JK cells were either treated with PMA/Ionophore or with  $\gamma$ -radiation. *Fas* transcriptional expression level is normalized using C57BL/6J as a calibrator.

that the susceptibility of certain tumour cells might be attributed to a reduction of their *Fas/Fas ligand*-mediated apoptosis. In humans, both germline and somatic mutations of the *Fas* gene have been associated with an increased risk of both lymphoid and solid tumours (Muschen *et al.*, 2000).

In a previous paper, we reported that the expression of *Fas* is scarcely perceptible in  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas in the susceptible mouse strains C57BL/6J and BALB/cJ (Santos *et al.*, 2001). In addition, we evidenced the existence of a thymic lymphoma-resistance locus (*Tlyr-1*) on chromosome 19 in a region containing *Fas* as a putative candidate modifier gene (Santos *et al.*, 2002). To assess whether *Fas* is involved in  $\gamma$ -radiation-induced susceptibility to

thymic lymphomas, we analysed the *in vivo* pattern of transcriptional expression of this gene through quantitative real-time RT-PCR in thymuses from mice treated either with single high doses or four sublethal doses of radiation. As expected, *Fas* expression is essentially absent in thymic lymphomas, suggesting that such a reduction may favour the development of thymic lymphomas. Remarkably, we likewise detected an *in vivo* overexpression in the early and late response to radiation. This increase after treatment with  $\gamma$ -irradiation includes both immature thymocytes that other authors described in splenic T cells from treated mice and cell suspensions of peripheral T cells irradiated in test tubes (Reap *et al.*, 1997; Booker *et al.*, 1998; Pinkoski and Green, 1999; Siegel *et al.*, 2000). This suggests that the *Fas/Fas ligand* system might also be critical in eliminating damaged cells within the thymus after  $\gamma$ -radiation treatments. In addition, the overexpression of *Fas* after the period of latency (i.e., long after the radiation treatment) could be attributed to some kind of epigenetic mechanism and extends the importance of the *Fas/Fas ligand* system to maintain a phenotype of resistance in more advanced stages of tumour development. Tumours develop multiple mechanisms to evade the immune response, deletions of antitumour lymphocytes by *Fas* expression being one of them (Krammer, 2000; Sibley *et al.*, 2003). However, there exist conflicting results on the role played by *Fas* in thymocyte development. Although several papers proposed that *Fas* is not required for thymic selection (Nagata and Suda, 1995; Adachi *et al.*, 1996), other studies appear to demonstrate that *Fas* is expressed by immature thymocytes (Nishimura *et al.*, 1995; Ogasawara *et al.*, 1995) and highlight the importance of *Fas* in the control of negative selection of such cells (Castro *et al.*, 1996; Fleck *et al.*, 1998; Kishimoto *et al.*, 1998; Kurasawa *et al.*, 1999). Given that we detected an overexpression of *Fas* in those thymuses that resisted to be transformed and an absence of *Fas* in thymic lymphomas, our data clearly stress the critical role of *Fas* signalling in protecting against tumorigenesis.

In order to assess whether *Fas* might play a role as a germline modulator of resistance/susceptibility, we studied the patterns of expression in a panel of five mouse strains exhibiting differences in their degree of resistance/susceptibility to the development of  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas. Interestingly, we found that the highest levels of expression occurred in the extremely resistant strains SPRET/Ei and SEG/Pas, and the lowest levels in the most susceptible strains C57BL/6J and RF/J. In addition, the strain BALB/cJ, which exhibited an intermediate degree of susceptibility, also showed an intermediate level of transcription.

Since there are several reports in humans suggesting an association between polymorphisms in the *Fas* promoter and the risk of developing several diseases including neoplastic processes (Feuk *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2003; Sibley *et al.*, 2003), we decided to analyse the promoter sequence of the five strains and to explore their functionality through luciferase assays. We detected many polymorphisms distributed along the entire

promoter region, some of them affecting critical transcriptional factor sites. Sequencing data allowed us to classify the promoters of the five strains into three different haplotypes that also exhibited significant differences in their promoter activity. Remarkably, the differential response of the promoters to single high doses of radiation supports the hypothesis that *Fas* promoters differences are responsible (at least in part) for the recorded differences in the radiation-induced expression of this gene. A linear regression analysis revealed a clear association between promoter activities and levels of transcriptional expression of *Fas*, indicating that the structural differences detected among the promoters clearly contribute to the pattern of differential expression of *Fas* in these strains.

It may be useful to stress that the expression of *Fas* is extremely low in  $\gamma$ -radiation thymic lymphomas regardless of strain susceptibility, confirming that this reduction should be a necessary step in order to attain the tumour phenotype. Furthermore, since thymic lymphomas from all strains retain similar low levels of *Fas* expression (i.e. there do not exist significant differences among *Fas* expression levels in thymic lymphomas from the three groups of strains), we suggest the existence of a common 'tumour-threshold' of *Fas* expression below which any thymus may develop into a thymic lymphoma. If this were so, it would be reasonable to assume that thymic lymphomas would be more frequent in those strains that exhibit a lower basal and radiation-induced levels of expression ('susceptible' strains) compared to those exhibiting higher levels ('resistant' strains).

As mentioned, the promoter of mouse strains C57BL/6J and RF/J exhibits the lowest luciferase activity. Since the promoter of BALB/cJ differs from that of C57BL/6J only in a base substitution affecting a transcription binding site (AP1) (Figure 3), it is reasonable to think that this alteration should be responsible for the intermediate level of promoter activity observed in this strain. Such phenomenon could possibly occur by altering the affinity of binding to DNA of some transcription factors such as *Jun* and/or *Fos*. Interestingly, *c-fos* is a transcription factor overexpressed during negative selection inside the thymus (DeRyckere *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 2003) and the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway also appears to play an important role in this selection (DeRyckere *et al.*, 2003). Finally, the promoter of the *M. spretus* group (SPRET/Ei and SEG/Pas) that exhibited the highest level of luciferase activity differs from that of C57BL/6J by two major modifications located at two critical sites (NF- $\kappa$ B and NF-AT sites) that are known to be important for the transcriptional regulation of the human and mouse *Fas* promoters and have been involved in the generation and survival of thymocytes as well as in apoptosis within the thymus (Oukka *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1999; Hettmann *et al.*, 1999; Hettmann and Leiden, 2000; Zheng *et al.*, 2001).

Taken together, all these findings indicate that there exist several promoter polymorphisms between the different mouse strains that define three groups of

functional alleles exhibiting different degrees of *Fas* mRNA expression in response to  $\gamma$ -irradiation. It is further suggested that these *Fas* variants might be involved in modulating the resistance/susceptibility phenotype of mice to  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas. However, further studies are needed in order to confirm this last suggestion. Since *Fas* is a receptor protein that acts in conjunction with its ligand (*FasL*), and intriguing differences between the sequence of *FasL* in different mouse strains (Reap *et al.*, 1997) have been reported, additional *in vivo* or *in vitro* studies based on the simultaneous manipulation of both genes will be required.

## Materials and methods

### Mice and treatments

Mice from the strains C57BL/6J, RF/J, BALB/cJ and SPRET/Ei were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). SEG/Pas was provided by Dr JL Guenet (Institute Pasteur, Paris). A fraction of the adult mice (35–65 days) were treated with lethal single high dose of  $\gamma$ -irradiation (10 Gy) and killed 24 h later. Other mice were subjected to whole body  $\gamma$ -irradiation split into four weekly sublethal doses of 1.75 Gy. Thymic lymphomas were observed to develop at regular intervals of 25 weeks following treatment and were characterized as has been previously described (Santos *et al.*, 2002). In our experimental conditions, the strains C57BL/6J and RF/J (both derived from *M. musculus*) exhibited a global incidence of 73.4% (Santos *et al.*, 1996). In contrast, SPRET/Ei and SEG/Pas, both derived from *M. spretus*, are extremely resistant with a tumour incidence of only 3% (Santos *et al.*, 2002). As far as the BALB/cJ strain, also derived from *M. musculus*, is concerned, an intermediate incidence of tumours of around 60% was detected (Meléndez *et al.*, 1999). For animal experimentation, we followed the ethical considerations available from the European Commission (Directive 86/609/CEE) for the humane care and use of laboratory animals.

### Quantitative RT-PCR

RNA from the thymus was obtained using Tripure reagent (Roche, Mannheim, Germany). The determination of the transcript levels was performed by quantification assays on the basis of real-time RT-PCR with a LightCycler instrument (Roche Diagnostic, Penzberg, Germany) using fluorescence-resonance energy-transfer (FRET) hybridization methodology. The gene encoding the tubulin beta 5 chain (*Tubb5*) was used as an internal control of the RNA quality and amplification. Primers and FRET probes were as follows: mFas-f: 5'-CGCC CGCTGTTTTCCCTT-3'; mFas-r: 5'-AGCAAAATGGGCC TCCTTG-3'; mFas-FL: 5'-TTAACTGTGAGCCAGCAAGC ACCAGA-3'; mFas-LC: 5'-CAGGACAGCCCATCCAC AGCAT-3'; *Tubb5*-f: 5'-TGGGACTATGGACTCCGTTTC-3'; *Tubb5*-r: 5'-GTGGGTCAGCTGAAAGCCT-3'; *Tubb5*-FL: 5'-GGCCTTTAGCCAGTTGTTGCCT-3'; *Tubb5*-LC: 5'-CC CCAGACTGACCGAAAACGAAGTT-3'.

The hybridization probes were designed by TibMolBiol (Berlin, Germany). Reactions for real-time PCR were performed using the one-step LightCycler kit (Roche). In all, 400 ng of total cellular RNA from each thymus sample were used to generate cDNA in a reaction containing 3.25 mM of Mn(OAc)<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.2  $\mu$ M of each probe and 1  $\times$  LC RNA Master Hybridization Probes mix (Roche). The cDNAs of *Fas* and *Tubb5* were subsequently coamplified using

the following PCR conditions: 95°C for 2 min followed by 40 cycles with 95°C for 10 s, 55°C for 30 s and 72°C for 15 s. All PCR reactions were repeated for each sample in three independent experiments. *Fas* expression levels were calculated with the LightCycler Relative Quantification software (Roche).

#### Genotyping of the mouse *Fas* promoters

DNA from the thymus was extracted using DNAzol reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Based on the sequence of the 129/svJ *Fas* promoter, reported in 2001 (Zheng *et al.*, 2001; GenBank accession number AY027814), three overlapping primer pairs for the PCR amplification: FasProm1-F: 5'TGTTGGCATGTAGGGATGAA 3'; FasProm1-R: 5'AAATAGGTAGTTATGATGGGAA GATCA 3'; FasProm2-F: 5'TGATCTTCCCATCATA ACTACCTATTT 3'; FasProm2-R: 5'ACTTTGGCTG ATTGCTGGAG 3'; FasProm3-F: 5'GGCAAATGG TCTTTGTCTC 3'; FasProm3-R: 5'GTCTGCAGCAA GGGAAAACA 3'. With these primers, three fragments of 415, 426 and 495 bp comprising from nucleotide -1272 to the translational start site (not included) were amplified. PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels containing ethidium bromide. DNA extracted from agarose gel bands was purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany), then sequenced on an ABI Prism 310 Automated Sequencer (Applied Biosystems). A comparison between the sequences thus obtained and those previously reported for the promoter of 129/svJ (Zheng *et al.*, 2001) was made using the program L-Align from ExPASy Molecular Biology Server.

#### Cloning of the *Fas* promoters and reporter constructs

A couple of primers for amplifying the *Fas* promoter containing two distinct restriction sites for *KpnI* and *XhoI* were designed. These enzymes do not cut inside the *Fas* promoter region and are included in the multiple cloning site of pGL2-Basic plasmid (Promega, Madison, WI, USA). The sequences of these primers are as follows (generated restriction sites underlined): FasPromKX-F: 5'ATCTTCCGGTACCAAGA TGTTGGCAT 3'; FasPromKX-R: 5'ATGCTGCAGCTCG AGAAAACAGCG 3'. Using the Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostic, Germany) and the aforementioned primers, a fragment containing the *Fas* promoter and part of exon 1, from nucleotide -1272 to the translational start site, was amplified. The PCR products were electrophoresed in 1%

agarose gel containing ethidium bromide and purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Finally, fragments were doubly digested with *KpnI* and *XhoI* (Roche Diagnostic, Germany) and cloned into pGL2-Basic.

#### Cell culture, transient transfections and luciferase assays

Jurkat T cells were cultured in RPMI supplemented with 10% FBS, penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 U/ml), HEPES (10 mM), L-glutamine (2 mM) (Gibco, Carlsbad, CA, USA), sodium pyruvate (1 mM) and MEM nonessential amino acids 1 × (Biowhittaker, Cambrex Corporation, East Rutherford, New Jersey, USA). Transfections were performed using Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). At 24 h after transfection, cells were either assayed for luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) or activated either with PMA (100 ng/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) and calcium ionophore (1 µM, Sigma) for 6 h before assaying for luciferase activity, or with a 10 Gy-γ radiation treatment (10<sup>6</sup> cells/ml PBS) for ten hours before assaying for luciferase activity. For normalization, the pRL-tk Renilla Normalizing Luciferase Vector (Promega), cotransfected with pGL2 constructs, was used. Both Firefly and Renilla luciferase activities were monitored using a Sirius luminometer (Berthold, Germany).

#### Statistical methods

The Kolmogorov-Smirnov test was used to check the data sets for normality, and Levene's test was used to test for homogeneity of variances. Statistical significances were determined using a one-way ANOVA with a Tukey comparison post test. All statistical tests were done using SPSS software (SPSS Inc., version 12.0, Chicago, IL, USA).

#### Acknowledgements

We thank L González, M Matabuena, M Guerrero, MJ Bueno and R Peregil for aid with animals, P Fernández for helping with statistical analysis and E Pérez-Gómez for technical assistance. We are also grateful to Professor A Morales for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the European Commission (EURATOM Work Programme 2003, FI6R-CT-2003-508842 to JS), 'Ministerio de Educación y Ciencia' (SAF2003-05048) and 'Ministerio de Salud y Consumo' (Lymphoma Network, G03/179) to JF-P. MV-M is the recipient of a predoctoral fellowship from 'Ministerio de Educación y Ciencia' (FPU AP2002-0294).

#### References

- Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J *et al.* (1996). *Proc Natls Acad Sci USA* **93**: 2131-2136.
- Booker JK, Reap EA, Cohen PL. (1998). *J Immunol* **161**: 4536-4541.
- Castro JE, Listman JA, Jacobson BA, Wang Y, López PA, Ju S *et al.* (1996). *Immunity* **5**: 617-627.
- Chan H, Bartos DP, Owen-Schaub LB. (1999). *Mol Cell Biol* **19**: 2098-2108.
- DeRyckere D, Mann DL, DeGregory J. (2003). *J Immunol* **171**: 802-811.
- Feuk L, Prince JA, Blennow K, Brookes AJ. (2003). *Hum Mutat* **21**: 53-60.
- Fleck M, Zhou T, Tatsuta T, Yang P, Wang P, Mountz JD. (1998). *J Immunol* **160**: 3766-3775.
- Hettmann T, DiDonato J, Karin M, Leiden JM. (1999). *J Exp Med* **189**: 145-157.
- Hettmann T, Leiden JM. (2000). *J Immunol* **165**: 5004-5010.
- Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR *et al.* (2003). *Hum Mol Genet* **12**: 2249-2254.
- Kishimoto H, Surh CD, Sprent J. (1998). *J Exp Med* **187**: 1427-1438.
- Krammer PH. (2000). *Nature* **407**: 789-795.
- Kurasawa K, Hashimoto Y, Iwamoto I. (1999). *Cell Immunol* **194**: 127-135.
- Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, Yu MH, Yu CP, Liu HS *et al.* (2003). *Int J Cancer* **103**: 221-225.
- Maas K, Westfall M, Pietenpol J, Olsen NJ, Aune T. (2005). *Arthritis Rheumatism* **52**: 1047-1057.

- Meléndez B, Santos J, Fernández-Piqueras J. (1999). *Oncogene* **18**: 4166–4169.
- Muschen M, Warskulat U, Beckann MW. (2000). *J Mol Med* **78**: 312–325.
- Nagata S, Suda T. (1995). *Immunol Today* **16**: 39–43.
- Nishimura Y, Ishii A, Kobayashi Y, Yamasaki Y, Yonehara S. (1995). *J Immunol* **154**: 4395–4403.
- Ogasawara J, Suda T, Nagata S. (1995). *J Exp Med* **181**: 485–491.
- Oukka M, Ho C, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. (1998). *Immunity* **9**: 295–304.
- Pinkoski MJ, Green DR. (1999). *Cell Death Differ* **6**: 1174–1181.
- Rathmell JC, Thompson CB. (2002). *Cell* **109**: S97–S107.
- Reap EA, Roof K, Maynor K, Borrero M, Booker J, Cohen PL. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5750–5755.
- Santos J, Herranz M, Fernández M, Vaquero C, López P, Fernández-Piqueras J. (2001). *Oncogene* **20**: 2186–2189.
- Santos J, Montagutelli X, Acevedo A, López P, Vaquero C, Fernández M *et al.* (2002). *Oncogene* **21**: 6680–6683.
- Santos J, Pérez de Castro I, Herranz M, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. (1996). *Oncogene* **12**: 669–676.
- Schmitz I, Clayton LK, Reinherz EL. (2003). *Int Immunol* **15**: 1237–1248.
- Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL *et al.* (2003). *Cancer Res* **63**: 4327–4330.
- Siegel RM, Chan KM, Chun HJ, Lebaro MJ. (2000). *Nat Immunol* **1**: 469–474.
- Zheng Y, Ouaz F, Bruzzo P, Singh V, Gerondakis S, Beg AA. (2001). *J Immunol* **166**: 4949–4957.



# Lack of correlation between DNA copy number and mRNA expression levels of *c-myc* in $\gamma$ -radiation-induced mouse thymic lymphomas by using quantitative real-time PCR

Javier Santos, Concepción Vaquero, Janet Reyes, Pilar López-Nieva, María Matabuena, María Villa, Pablo Fernández and José Fernández-Piqueras

Departamento de Biología. Laboratorio de Genética Molecular Humana. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Spain.

**Background.** It is well documented that over-expression of the *c-myc* proto-oncogene occurs in the vast majority of mouse thymic lymphomas induced by  $\gamma$ -irradiation, evidencing the importance of this gene in T-cell lymphomagenesis. However, it remains unknown whether elevated levels of *c-myc* expression are driven by extra *c-myc* copy numbers. **Materials and methods.** Here we use a quantitative test on the basis of real-time PCR to determine the cellular copy number of *c-myc* in a set of 14  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas obtained from (C57BL/6J x BALB/cJ) F1 hybrid mice with increased mRNA *c-myc* expression.

**Results.** Since 5 out of 14 (35.7%) cases had no extra copy numbers of *c-myc*, gene amplification was obviously not the cause of *c-myc* over-expression in these tumours. In the remaining 9 tumours, *c-myc* over-expression was also accompanied with extra DNA copy numbers. Therefore, *c-myc* amplification might be a consequence of the genomic instability subsequent to the up-regulation of *c-myc*. However, linear regression analysis showed a lack of correlation between increasing DNA copy numbers and mRNA over expression of *c-myc* in these tumours ( $r = 0.029$ ,  $p = 0.94$ ).

**Conclusion.** De-regulation of *c-myc* does not necessarily imply amplification of this gene in these tumours. This report is, to our knowledge, the first one comparing *c-myc* amplification with expression in lymphomas of the T-cell lineage.

**Key words:** *c-myc*, gene dosage, mRNA levels, real-time PCR, mouse thymic lymphomas, gamma-irradiation.

Correspondence: J. Santos.  
Departamento de Biología.  
Laboratorio de Genética Molecular Humana.  
Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.  
Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 15. Campus de Canto Blanco.  
28049 Madrid. Spain.  
E-mail: javier-santos@uam.es

Received 5 July 2005; Revised 2 December 2005;  
Accepted 7 December 2005.

Santos J, Vaquero C, Reyes J et al. Lack of correlation between DNA copy number and mRNA expression levels of *c-myc* in  $\gamma$ -radiation-induced mouse thymic lymphomas by using quantitative real-time PCR. *Clin Transl Oncol.* 2006;8 (5):349-53.

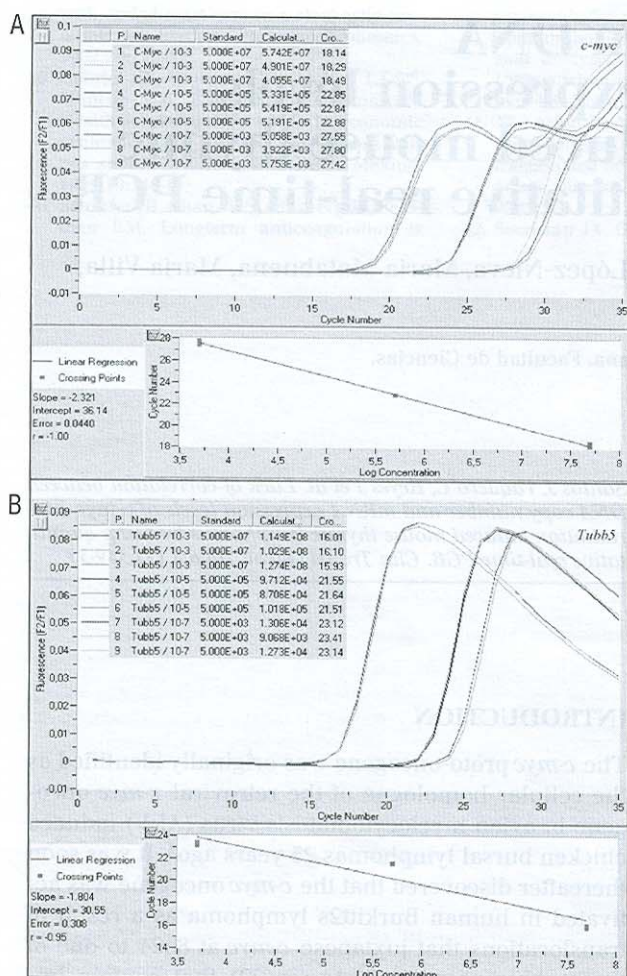
## INTRODUCTION

The *c-myc* proto-oncogene was originally identified as the cellular homologue of the retroviral *v-myc* oncogene in avian myelocytomatosis virus (ALV)-induced chicken bursal lymphomas 25 years ago<sup>1</sup>. It was soon thereafter discovered that the *c-myc* oncogene was activated in human Burkitt's lymphoma as a result of translocations that juxtapose *c-myc* at 8q24 to one of three chromosomes (2, 14, or 22) that contain immunoglobulin genes<sup>2</sup>. Subsequently, an elevated expression of *c-myc* revealed a common denominator in the development of a broad range of human and mouse solid tumours as well as myeloid leukemias and lymphomas<sup>3</sup>.

Trisomy 15 is a frequent chromosomal aberration found in murine thymic lymphomas regardless of the inducing agent<sup>4-8</sup>. The relevant event of mouse chromosome 15 contributing to thymic lymphomagenesis is the duplication of the D2/3 region<sup>9</sup>, known to contain the *c-myc* proto-oncogene<sup>10</sup>. Interestingly, we have recently reported that *c-myc* is over-expressed in all of the  $\gamma$ -radiation-induced primary thymic lymphomas examined<sup>11</sup>. Transgenic models have also demonstrated that *c-myc* over-expression leads to thymic lymphomagenesis<sup>12</sup>. However, it remains unknown whether *c-myc* over-expression correlates with the number of extra gene copies in these tumours.

To determine the latter, we investigated in this study the cellular copy number of *c-myc* in a set of 14  $\gamma$ -radiation-induced mouse thymic lymphomas obtained from mice with increased mRNA *c-myc* expression by the use of a quantitative real-time PCR (qRT-PCR) methodology, which has recently proven to be a highly sensitive method to determine the DNA copy num-





**Fig. 1. Construction of the standard curves for *c-myc* (A) and *Tubb5* (B).** The amplification curves for reactions with starting *Tubb5* gene fragment copy number ranging from  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^3$ . Three replicates were performed for each standard sample. B. Standard curves were constructed by plotting log starting copy number vs crossing point (Cp).

ber of specific genes and a preferable alternative to other forms of quantitative PCR<sup>13,14</sup>. Our results showed a lack of correlation between increasing *c-myc* copy number and mRNA expression in these tumours.

## MATERIALS AND METHODS

### Tumour samples

Samples used in this study were obtained from 14 primary thymic lymphomas induced by  $\gamma$ -rays in (C57BL/6J  $\times$  BALB/cJ) F1 mice as we described elsewhere<sup>15</sup>. DNA was extracted from thymus according to the DNazol method (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA).

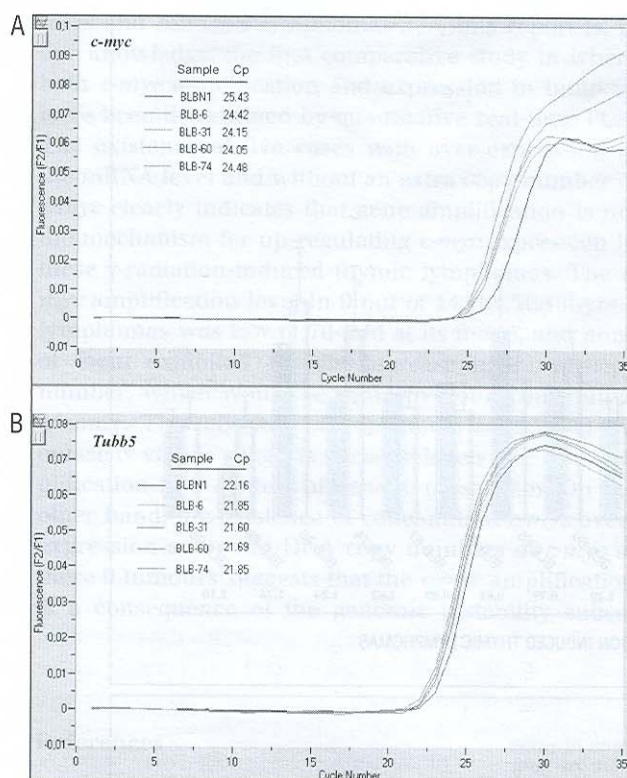
### Quantitative real-time PCR

For determination of the *c-myc* gene dosage we established a quantification assay on the basis of real-time PCR. The quantification was performed with a LightCycler instrument (Roche Diagnostics Germany) by use of the fluorescence-resonance energy-transfer (FRET) technique<sup>16</sup>. This method works with two oligonucleotide probes that bind to the target DNA, one carrying a fluorescent reporter at its 3' end (fluorescein), whereas the other carries a fluorescent acceptor dye at 5' end (LightCycler-Red 640). When the probes bind to the amplified DNA in a head-to-tail arrangement, the dyes are close enough for FRET to occur. A fluorescence detection system of LightCycler measures the amount of the amplification product after each cycle. Real-time fluorescence monitoring on the LightCycler offers a convenient way to identify and measure the log-linear cycles by determining the crossing points (Cp), the cycle which is assumed to represent the same amount of PCR product in every curve. The Cp is considered the most reliably proportional point to the initial concentration because at this point PCR amplification starts to become clearly positive above the background phase. Thus, the copy number of target gene in unknown samples is quantified by measuring Cp and by using a standard curve to determine the number of starting copies. The samples with higher copy numbers show earlier significant increments in fluorescence, which are defined by lower Cp.

Several steps prior to performing a real-time PCR, including cell processing, DNA extraction, DNA storage, and assessment of DNA concentration, may introduce potential variability in the procedure. To compensate for this, the DNA copy number of a tested gene has to be necessarily compared with that of a reference disomic gene. In our assay, we selected the gene encoding the beta 5 chain of tubulin (*Tubb5*) as the control gene for two main reasons. First, this gene is known to be involved in tumour development. Second, *Tubb5* was located in a region of chromosome 17 in which no allelic imbalances (gains or losses) have been found by loss of heterozygosity (LOH) analysis in this type of tumours, as we have previously demonstrated<sup>17,18</sup>. According to this, the copy number of *c-myc* was expressed, as a quotient, in relation to the copy number of *Tubb5* gene (N) to normalize the amount and quality of DNA.

Two standard curves were generated for the calculation of the amount of PCR product since the *c-myc* and *Tubb5* qrtPCR reactions did not exhibit similar amplification efficiencies. These curves were analyzed by evaluating the slope and the correlation coefficient (r) in each case (figs. 1 and 2). PCR fragments used in the generation of the standard curves were obtained by amplifying 250 nanograms of genomic DNA from a non-treated (C57BL/6J  $\times$  BALB/cJ) F1 hybrid with the same primers used later for real-





**Fig. 2.** Representative online fluorescence curves of LightCycler-assisted PCR amplification of *c-myc* (A) and *Tubb5* (B) gene fragments from a control sample (BLBN1) and four  $\gamma$ -radiation thymic lymphomas (BLB-6, BLB-31, BLB-60, and BLB-74). The crossing points (Cp) of *Tubb5* amplicons were very similar in the control and four tumour samples. By contrast, the four thymic lymphomas showed Cp of *c-myc* reactions lower than the normal sample, meaning that *c-myc* was amplified in these tumours.

time PCR, following standard PCR conditions described elsewhere<sup>14</sup>. The amplified products were separated on 2% agarose gels, purified with the GeneClean kit (Bio101, Carlsbad, CA, USA) and spectrophotometrically quantified. The standard curves used for the quantitative real-time PCR analysis were constructed with serial dilutions of PCR products in triplicate ranging from  $10^{-5}$  ( $5 \times 10^7$  copies of each gene) to  $10^{-7}$  ( $5 \times 10^5$  copies) (fig. 1).

Primers and FRET probes for *c-myc* were 5'-AGGAGCTGGAATCTCTCGTG-3' (forward), 5'-GTTAAAATTATGGCTGAAGCTTACA-3' (reverse), 5'-TGACAGAAGCTGATGCGCTGGAATTAA-3' (fluorescein) and 5'-ATGCATGCCAAAGCCCTAACCTCACA-3' (LCRed640). For *Tubb5*, 5'-CCTACAATGCCACCCTGTCT-3' (forward), 5'-TTCAGGTCTCCGTAGGTTGG-3' (reverse), 5'-ATCGACAACGAGGCCCTCTACG-3' (fluorescein) and 5'-CATCTGCTTCCGTACCTCAAGCTC-3' (LCRed640). The hybridization probes were designed by TibMolBiol, Berlin, Germany.

Reactions for real-time PCR were performed in a total volume of 20  $\mu$ l containing 250 nanograms of total ge-

nomeric DNA, 4 mM of  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.2  $\mu$ M of each probe and 1x LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes mix (Roche). The PCR conditions were: 95 °C for 2 min following by 30 cycles with 95 °C for 10 s, 55 °C for 30 s (in this step the online measurements take place) and 72 °C for 15 s. All PCR reactions for each sample were repeated in three independent experiments.

## RESULTS

DNA copy number of *c-myc* was determined by real-time quantitative PCR on genomic DNA extracted from 14  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas obtained from (C57BL/6J  $\times$  BALB/cJ) F1 hybrids with increased mRNA *c-myc* expression (fig. 2). To determine the cut-off point for gene amplification in these tumours, three normal thymus DNA samples obtained from untreated (C57BL/6J  $\times$  BALB/cJ) F1 hybrid mice were tested for the *c-myc* gene dose (N). The N value of these samples ranged from 0.79 to 0.84 (mean  $0.81 \pm 0.025$  sd). Figure 3 summarizes the cellular copy number of *c-myc* obtained in the three independent experiments performed for the 14 tumour DNA samples. N values for *c-myc* in four tumours (28.6%) fell between 0.75 and 0.89, being therefore indicative of normal *c-myc* copy numbers. By contrast, 9 out of 14 (64.3%) thymic lymphomas consistently showed N values higher than those found in normal thymus, and were considered to represent gene amplification in tumour DNA. Previous to this work, we studied the mRNA levels of *c-myc* in the same set of  $\gamma$ -radiation-induced mouse thymic lymphomas by quantitative real-time LightCycler RT-PCR, demonstrating transcriptional over-expression with normalized expression values that ranged from 1.4 to 5.57-fold increases in all of the analyzed tumours<sup>11</sup>. Interestingly, we observed frequent discrepancies between the number of extra copies and the levels of mRNA expression of *c-myc* (fig. 3). In this way, tumour BLB60 had a relatively low number of extra copies (N = 1.20) with a 3.01 fold increase in *c-myc* RNA levels. Additionally, one of the tumours with no extra copy number of *c-myc*, BLB30 (N = 0.77), was the one to show the highest mRNA expression (5.57-fold increase). In an opposite way, there was a case (BLB6) with much lower transcriptional expression of *c-myc* (1.40-fold increase) in which real-time PCR showed one of the highest levels of gene amplification (N = 1.75). Linear regression analysis for the nine tumours with *c-myc* amplification showed no association between increasing *c-myc* copy number and increasing *c-myc* mRNA level ( $r = 0.029$ ,  $p = 0.94$ ).

## DISCUSSION

In this study we used a real-time PCR system based on the detection and quantification of fluorescent FRET



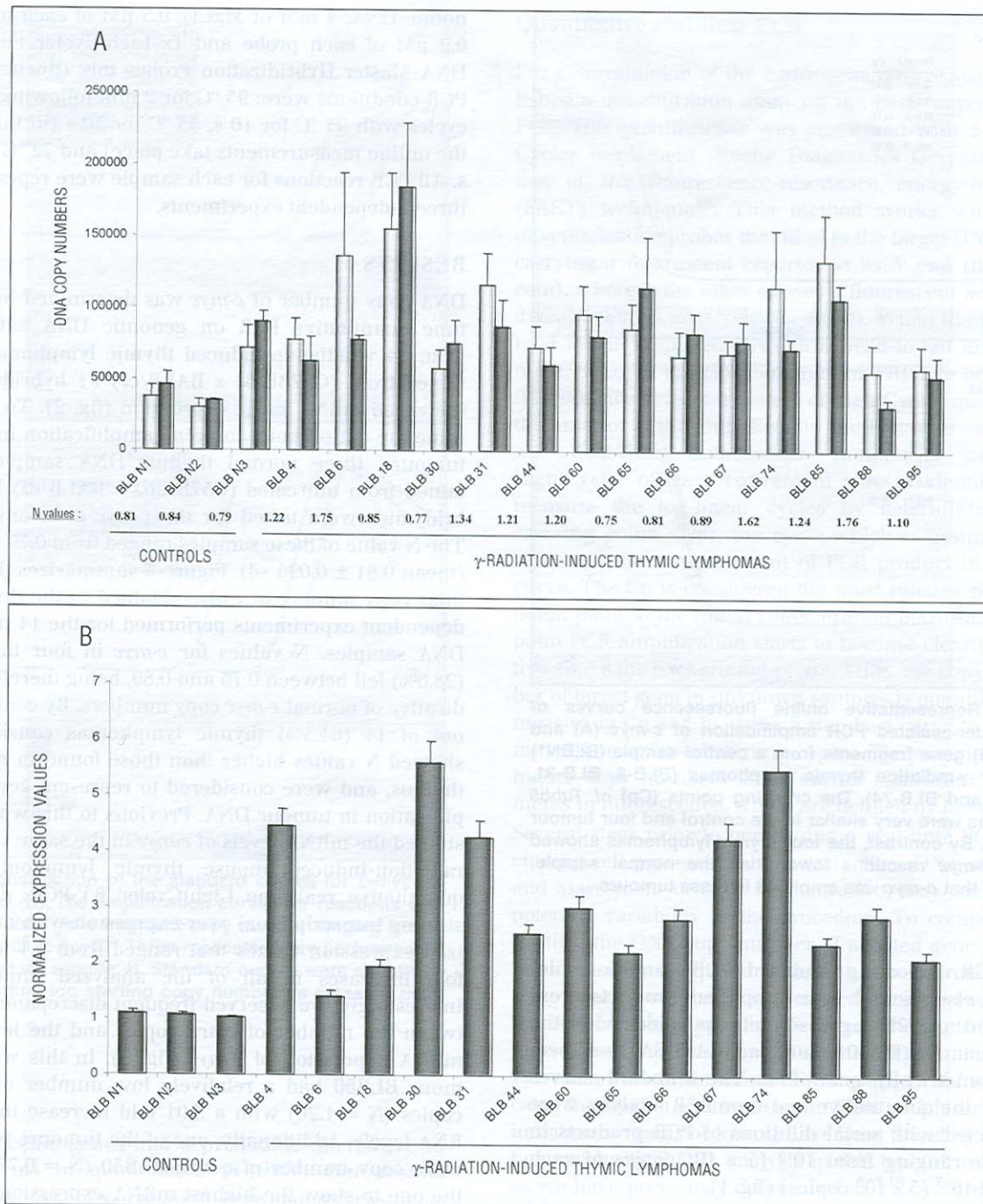


Fig. 3. DNA copy number and mRNA expression levels of *c-myc* in normal thymus and  $\gamma$ -radiation-induced mouse thymic lymphomas. A) *c-myc* and *Tubb5* gene dosage. B) relative mRNA expression of *c-myc*. \*Data from López-Nieva et al, 2004<sup>11</sup>.

reporters to determine *c-myc* gene amplification on mouse primary thymic lymphomas that overexpressed this gene. The DNA amplification levels of *c-myc* we found in normal thymus (mean N value = 0.81) did not significantly differ from those reported by other authors in normal human leukocyte samples (mean N value = 0.84) using the fluorescent Taqman methodology and the *Albumin* gene (*Alb*) as reference

disomic gene<sup>19</sup>. Taken together, these data clearly indicate that qrt-PCR is a highly sensitive and reproducible methodological approach that may be used to estimate the *c-myc* copy number in DNA samples.

Although a number of studies have already compared *c-myc* amplification with expression using different methodologies in different types of tumours, including human colorectal cancers, medulloblastomas, leuke-



mias and Burkitt's lymphomas<sup>20-22</sup>, this report is, to our knowledge, the first comparative study in where both *c-myc* amplification and expression in tumours have been determined by quantitative real-time PCR. The existence of five cases with over-expression at the mRNA level and without an extra copy number of *c-myc* clearly indicates that gene amplification is not the mechanism for up-regulating *c-myc* expression in these  $\gamma$ -radiation-induced thymic lymphomas. The *c-myc* amplification level in 9 out of 14 (64.3%) thymic lymphomas was low (1.76-fold at its most), and none of them exhibited 1.5-fold increase in *c-myc* copy number, which would be indicative of a constitutive trisomy. This absence of adjustment to 1.5-fold increase N values suggests variable levels of *c-myc* amplification in a context of genetic mosaicism. On the other hand, the existence of concomitant *c-myc* over-expression and extra DNA copy numbers of *c-myc* in these 9 tumours suggests that the *c-myc* amplification is a consequence of the genomic instability subse-

quent to the up-regulation of *c-myc*. This is in concordance with previous evidence revealing that the de-regulation of certain oncogenes may induce genomic instability<sup>23,24</sup>. Moreover recent studies analyzing transgenic mice in which *c-myc* was conditionally expressed in lymphoid cells, specifically demonstrated that the over-expression of *c-myc* alone can induce *c-myc* amplification<sup>25</sup>. However, the lack of correlation between increasing DNA copy numbers and mRNA over-expression of *c-myc* reported here clearly indicates that the de-regulation of *c-myc* does not necessarily imply amplification of this gene in these tumours.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part with funds from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2003-05048) and the Lymphoma Network from the Ministry of Health and Consume (G03/179) to Fernández-Piqueras J.

## References

- Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. Isolation and characterization of *c-myc*, a cellular homolog of the oncogene (*v-myc*) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol*. 1982;42:775-9.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human *c-myc* onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:7824-7.
- Spencer CA, Groudine M. Control of *c-myc* regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res*. 1991;56:1-48.
- McMorrow LE, Newcomb EW, Pellicer A. Identification of a specific marker chromosome early in tumour development in gamma-irradiated C57BL/6J mice. *Leukemia*. 1988;2:115-9.
- Muto M, Chen Y, Kubo E, Mita K. Analysis of early initiating event(s) in radiation-induced thymic lymphomagenesis. *Jpn J Cancer Res*. 1996;87:247-57.
- Vasmel WL, Matthews EA, Gillis CP, et al. Distinct chromosomal abnormalities in murine leukemia virus-induced T- and B-cell lymphomas. *Int J Cancer*. 1989;43:1112-9.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumours in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2005;300:489-92.
- Liyanage M, Weaver Z, Barlow C, et al. Abnormal rearrangement within the alpha/delta T-cell receptor locus in lymphomas from *Atm*-deficient mice. *Blood*. 2000;96:1940-6.
- Silva S, Babonits M, Wiener F, Klein G. Further studies on chromosome 15 trisomy in murine T-cell lymphomas: mapping of the relevant chromosome segment. *Int J Cancer*. 1988;41:738-43.
- Banerjee M, Wiener F, Spira J, et al. Mapping of the *c-myc*, *prt-1* and immunoglobulin kappa genes in relation to the mouse plasmacytoma-associated variant (6;15) translocation breakpoint. *EMBO J*. 1985;4:5183-8.
- López-Nieva P, Santos J, Fernández-Piqueras J. Altered expression of *Notch1*, *Notch2*, *c-myc* and *Ikaros* in  $\gamma$ -radiation induced mouse thymic lymphomas. *Carcinogenesis*. 2004;25:1299-504.
- Stewart M, Cameron E, Campbell M, et al. Conditional expression and oncogenicity of *c-myc* linked to a CD2 gene dominant control region. *Int J Cancer*. 1995;55:1023-30.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993;11:1026-30.
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*. 2005;9:189-95.
- Santos J, Pérez de Castro I, Herranz M, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumour suppressor gene region of about 0.6 cM in gamma-radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. *Oncogene*. 1996;12:669-76.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22:130-9.
- Santos J, Herranz M, Pérez de Castro I, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. A new candidate site for a tumour suppressor gene involved in mouse thymic lymphomagenesis is located on the distal part of chromosome 4. *Oncogene*. 1998;17: 925-9.
- Meléndez B, Santos J, Fernández-Piqueras J. Loss of heterozygosity at the proximal-mid part of mouse chromosome 4 defines two novel tumour suppressor gene loci in T-cell lymphomas. *Oncogene*. 1999;18:4166-9.
- Bieche I, Olivi M, Champeme MH, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998;78:661-6.
- Rochlitz CF, Herrmann R, de Kant E. Over-expression and amplification of *c-myc* during progression of human colorectal cancer. *Oncology*. 1996;55:448-54.
- Hermes J, Neidt I, Luscher B, et al. *c-myc* expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int J Cancer*. 2000;89: 395-402.
- Rothberg PG, Erisman MD, Diehl RE, Rovigatti UG, Astrin SM. Structure and expression of the oncogene *c-myc* in fresh tumour material from patients with hematopoietic malignancies. *Mol Cell Biol*. 1984;4:1096-103.
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*. 2002;1:19-30.
- Gray JW, Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumours. *Carcinogenesis*. 2000;21:445-52.
- Marinkovic D, Marinkovic T, Mahr B, Hess J, Wirth T. Reversible lymphomagenesis in conditionally *c-myc* expressing mice. *Int J Cancer*. 2004;20:536-42.

# **A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas**

María Villa-Morales, Javier Santos and José Fernández-Piqueras\*

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 28049, Spain

\*Correspondence: email: [jf.piqueras@uam.es](mailto:jf.piqueras@uam.es). Phone: +34 914978203 / Fax number: +34 914978202.

## **KEY WORDS**

Fas/FasL system. Functional polymorphisms. Genetic susceptibility. T-cell-lymphomas. Gamma-irradiation.

## **RUNNING TITLE**

Fas/FasL in susceptibility to T-cell lymphomas.

## **FOOTNOTES**

MV-M is the recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (FPU AP2002-0294). This work was funded by grants from the European Commission (EURATOM Work Programme 2003, FI6R-CT-2003-508842)

to JS; and from the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2003-05048) to JF-P. We thank L. González and P. Cozar for aid with animals, E. Pérez-Gómez and S. Jiménez-Baranda for technical assistance, and Dr. J.L. Guenet for providing SEG/Pas mice. We are also grateful to Prof. A. Morales for critical reading of the manuscript.

## ABSTRACT

The Fas/FasL system mediates induced apoptosis of immature thymocytes and peripheral T-lymphocytes, but little is known about its implication in genetic susceptibility to T-cell malignancies. In this paper we report that the expression of *FasL* increases early in all mice after  $\gamma$ -radiation treatments, maintaining such high levels for a long time in mice that resisted tumour induction. However, its expression is practically absent in T-cell-lymphoblastic-lymphomas. Interestingly, there exist significant differences in the level of expression between two mice strains exhibiting extremely distinct susceptibilities that can be attributed to promoter functional polymorphisms. In addition, several functional nucleotide changes in the coding sequences of both *Fas* and *FasL* genes significantly affect their biological activity. These results lead us to propose that germ-line functional polymorphisms affecting either the levels of expression and/or the biological activity of both *Fas* and *FasL* genes could account for the genetic risk to develop T-cell lymphoblastic lymphomas, and support the use of radiotherapy as an adequate procedure to choose in the treatment of T cell malignancies.